

**Titre:** Développement d'une méthodologie permettant l'élaboration d'un modèle prédictif de la toxicité d'un contaminant organique en fonction des caractéristiques pédologiques  
**Title:**

**Auteur:** Katie Morin  
**Author:**

**Date:** 1998

**Type:** Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis

**Référence:** Morin, K. (1998). Développement d'une méthodologie permettant l'élaboration d'un modèle prédictif de la toxicité d'un contaminant organique en fonction des caractéristiques pédologiques [Mémoire de maîtrise, École Polytechnique de Montréal]. PolyPublie. <https://publications.polymtl.ca/8765/>  
**Citation:**

 **Document en libre accès dans PolyPublie**  
Open Access document in PolyPublie

**URL de PolyPublie:** <https://publications.polymtl.ca/8765/>  
**PolyPublie URL:**

**Directeurs de recherche:**  
**Advisors:**

**Programme:** Non spécifié  
**Program:**

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

DÉVELOPPEMENT D'UNE MÉTHODOLOGIE PERMETTANT L'ÉLABORATION  
D'UN MODÈLE PRÉDICTIF DE LA TOXICITÉ D'UN CONTAMINANT  
ORGANIQUE EN FONCTION DES CARACTÉRISTIQUES PÉDOLOGIQUES

KATIE MORIN  
DÉPARTMENT DE GÉNIE CHIMIQUE  
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

MÉMOIRE PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION  
DU DIPLÔME DE MAÎTRISE ÈS SCIENCES APPLIQUÉES  
(GÉNIE CHIMIQUE)  
DÉCEMBRE 1998



National Library  
of Canada

Acquisitions and  
Bibliographic Services

395 Wellington Street  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

Bibliothèque nationale  
du Canada

Acquisitions et  
services bibliographiques

395, rue Wellington  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

*Your file Votre référence*

*Our file Notre référence*

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-42918-0

**Canada**

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Ce mémoire intitulé:

DÉVELOPPEMENT D'UNE MÉTHODOLOGIE PERMETTANT L'ÉLABORATION  
D'UN MODÈLE PRÉDICTIF DE LA TOXICITÉ D'UN CONTAMINANT  
ORGANIQUE EN FONCTION DES CARACTÉRISTIQUES PÉDOLOGIQUES

présenté par: MORIN Katie

en vue de l'obtention du diplôme de: Maîtrise ès sciences appliquées

a été dûment accepté par le jury d'examen constitué de:

M. PERRIER Michel, Ph.D., président

M. SAMSON Réjean, Ph.D., membre et directeur de recherche

Mme. DESCHÊNES Louise, Ph.D., membre et codirectrice de recherche

Mme. RENOUX Agnès, Ph.D., membre



## REMERCIEMENTS

Il est parfois difficile d'imaginer le temps, les efforts, et le nombre de personnes qu'implique la réalisation d'un projet de maîtrise. Ainsi, mon projet a vu le jour des compétences, de la collaboration et du support de plusieurs spécialistes en divers domaines à qui j'aimerais adresser de sincères remerciements.

Je pense d'abord à mon directeur de recherche, Réjean Samson, ainsi qu'à mes deux co-directrices, Louise Deschênes et Agnès Renoux. Leurs conseils avisés, leur confiance et leur appui m'ont permis de progresser tout au long de mon travail.

Je voudrais exprimer ma gratitude à Jacques Bureau qui a partagé avec moi les mystères et surprises de l'écotoxicologie. Son dévouement, sa grande disponibilité, et la rigueur de ses conseils scientifiques ont été précieux et grandement appréciés.

Je remercie également les membres de l'équipe d'écotoxicologie de l'IRB pour l'aide technique et le prêt des équipements, en particulier Manon Sarrazin, Sabine Dodard et Jean Caumartin avec qui il fut un plaisir de travailler.

Une appréciation toute particulière est adressée à Manon Leduc, Pierre Gagné et Antonio Gatien pour leur collaboration à la phase expérimentale qu'ils ont su rendre agréable et enrichissante.

Enfin, j'aimerais remercier tout spécialement ma famille et Andreas qui, dans les succès comme les petits malheurs, ont été très compréhensifs, toujours présents, et n'ont jamais cessé de m'encourager dans la réalisation de mes projets.

## RÉSUMÉ

Une nouvelle approche de gestion des sols contaminés, basée sur l'analyse de risque, a récemment été entérinée par le Ministère de l'Environnement et de la Faune. Cette approche implique que les concentrations à atteindre lors d'une décontamination peuvent maintenant être fixées en tenant compte de facteurs influençant le risque associé à la contamination. Parmi ces facteurs, la composition du sol peut jouer un rôle prépondérant mais son influence demeure peu étudiée pour les composés organiques non polaires. Quelques études ont démontré que la toxicité des contaminants organiques est principalement reliée à la quantité de matière organique et d'argile présente dans le sol. Cependant, la relation entre le type de sol et la toxicité n'est pas clairement établie, et aucune étude exhaustive n'a été réalisée à ce sujet.

Ce projet visait à mettre au point une méthodologie permettant de développer un modèle de prédiction de la toxicité d'un contaminant organique non polaire en fonction de la composition du sol. Basée sur l'évaluation écotoxicologique de différents types de sol contaminés par une concentration unique d'un hydrocarbure aromatique polycyclique (HAP), cette méthodologie tient compte des facteurs externes pouvant également modifier l'expression de la toxicité (ex.: volatilisation).

La première étape impliquait le choix du nombre et de la composition des sols à l'aide d'un algorithme spécifique aux modèles statistiques impliquant des mélanges. Neuf compositions ont été retenues. Leur contenu en argile et matière organique varie respectivement de 5 à 30 % et de 0.5 à 5 %. Les sols contiennent également 25 % de limon et une quantité de sable qui dépend des proportions des autres composants. Pour obtenir les compositions désirées, des sols artificiels ont été préparés à l'aide d'un sol naturel auquel ont été ajoutés de la kaolinite et de la matière organique commerciales, de

même que du sable séparé mécaniquement du sol naturel. La porosité et la surface spécifique des 9 types de sol augmentent avec leur contenu en argile.

L'utilisation de deux tests de toxicité a été étudiée pour l'élaboration du modèle, soit la germination et la croissance de l'orge *Hordeum vulgare*, et la mortalité du ver *Eisenia foetida*. Le contaminant choisi devait être peu volatil et toxique pour les organismes des tests de toxicité. Des analyses chimiques et des tests de toxicité ont donc été effectués sur 4 HAP (pyrène, phénanthrène, fluorène, acénaphthène) dans un sol contenant des quantités médianes d'argile et de matière organique afin de déterminer lequel était le plus approprié pour l'élaboration d'un modèle prédictif.

Les résultats ont montré qu'aucun des HAP testés n'était toxique pour l'orge *Hordeum vulgare*, à l'exception de l'acénaphthène qui inhibait la croissance racinaire à des concentrations supérieures à 200 mg/kg de sol sec. Ce paramètre d'évaluation n'a pu être exploité à cause de difficultés techniques et d'un manque de reproductibilité des réponses observées. En ce qui concerne la mortalité du ver *Eisenia foetida*, des résultats très différents ont été obtenus selon les propriétés des HAP testés. Ainsi, les HAP peu mobiles (phénanthrène, pyrène) ont engendré des réponses toxiques extrêmement variables, non proportionnelles avec les concentrations de contaminant dans le sol. Les vers ont cependant été très sensibles aux HAP plus mobiles (fluorène, acénaphthène) et dans le cas du fluorène, les réponses étaient reproductibles. Ces composés sont toutefois assez volatils, d'où la difficulté d'en contrôler la concentration au cours de l'évaluation écotoxicologique.

Malgré sa volatilité, le fluorène a été choisi pour la réalisation du projet. Des analyses chimiques de la concentration de fluorène après la contamination dans 3 types de sol ont par ailleurs montré que la composition du sol n'influence pas la volatilisation. Ce facteur ne devrait donc pas introduire un biais important dans les réponses toxiques

observées lors de l'élaboration du modèle prédictif. La méthode de contamination et les conditions de réalisation des tests de toxicité ont toutefois été modifiés pour limiter la volatilisation du fluorène. La  $CL_{50}$  du contaminant pour le ver, concentration par laquelle les 9 sols seront contaminés lors de l'élaboration d'un modèle prédictif, est de 135 mg/kg de sol sec. À cause de son manque de sensibilité, le test de germination et croissance de l'orge a été abandonné.

Une expérience préparatoire a ensuite été effectuée pour valider la méthodologie développée, c'est-à-dire pour vérifier qu'une même concentration de fluorène (110 mg/kg de sol sec) engendre des réponses toxiques différentes dans divers types de sol. Cette expérience a été réalisée sur 5 des 9 sols à l'étude. Les résultats obtenus suggèrent que le contenu en argile et en matière organique ont un effet important sur la toxicité du fluorène. Ainsi, un sol qui contenait 5 % de matière organique n'a engendré aucune mortalité après 14 jours d'exposition alors que la mortalité des vers était atteinte en quelques jours dans un sol de texture similaire mais contenant 0.5 % de matière organique. De plus, deux sols contenant la même quantité de matière organique mais 5 et 30 % d'argile ont présenté des réponses toxiques fort différentes. Dans le sol contenant 5 % d'argile, les vers ont tous péri en quelques jours, alors que dans l'autre, 45 % des vers vivaient après 14 jours. La littérature ne rapporte aucun cas où des différences si marquées ont été observées, autant pour l'influence de l'argile que pour celle de la matière organique.

Ces résultats confirment que les 9 types de sol choisis présentent des propriétés intrinsèques qui modifient grandement la biodisponibilité du fluorène. Ce dernier s'avère d'ailleurs, à cause de la grande sensibilité des vers qui y sont exposés, un excellent modèle de contaminant. De plus, les différences marquées entre les diverses réponses toxiques laissent supposer que la réalisation d'un modèle de prédiction en fonction de la composition du sol est réalisable.

## ABSTRACT

A new management strategy for contaminated soils, based on risk assessment, has just been ratified by the MEF. This approach implies that the target concentrations in site decontamination can now be determined considering factors that might affect the risk associated with the contamination. One of the main factors is soil composition, which affects the bioavailability of contaminants to organisms living in soils, and thus their toxicity. However, little information is available on the influences of soil composition for a non polar organic contaminant. Some studies have shown that the toxicity is mainly influenced by the organic matter and clay content of the soil, but the lack of knowledge on the subject complicates the application of risk analysis.

The aim of this master project was to develop a methodology in order to elaborate a model predicting the toxicity of a nonpolar organic contaminant (a PAH) as a function of soil composition. Based on the ecotoxicological evaluation of different types of soils contaminated with a single concentration level of a PAH, this methodology also takes into account the external factors that could influence toxicity (e.g.: volatilization).

Nine different types of soils were first chosen with a statistical algorithm designed for mixture models. Their organic matter and clay contents range from 0.5 to 5 % and 5 to 30 % respectively. The soils also contain 25 % of silt and different proportions of sand. Artificial soils were prepared from a natural soil containing clay, silt, and sand. Commercial kaolinite and organic matter, as well as sand (mechanically separated from the natural soil) were added to the natural soil to obtain the desired compositions. The 9 types of soil exhibit increasing porosity and surface area with the clay content.

The utilization of two toxicity tests (germination and growth of barley (*Hordeum vulgare*), mortality of worms (*Eisenia foetida*)) has been studied. Preliminary experiments were conducted in order to choose a non volatile contaminant, which these organisms are sensitive to. Chemical analysis and toxicity tests were performed on 4 PAH (pyrene, fluorene, acenaphthene, phenanthrene) on a soil with an average clay and organic matter content.

Results showed that the PAH tested are non toxic for the germination and growth of barley, although acenaphthene inhibits root growth. Because of technical problems and a lack of reproductibility, inhibition of root growth can not be exploited for the elaboration of a prediction model. The toxicity of PAH on earthworms was shown to be highly dependent on their properties. Indeed, very important variability was observed in the mortality rates of the worms exposed to pyrene and phenanthrene, two non mobile contaminants. Their toxicity responses were not proportional to the concentration of the contaminant. On the other hand, worms were very sensitive to fluorene and acenaphthene, and showed reproducible mortality rates. Controlling the concentration of these two contaminants in the soil as a function of time is however very difficult because of their volatility.

The test using barley was rejected due to its low sensitivity to the 4 PAH tested. In spite of its volatility, fluorene was chosen for the elaboration of a prediction model. Chemical extractions on 3 different types of soil showed that the volatility of fluorene was not influenced by their composition. This result suggests that volatilization should not affect the mortality rate of the worms differently in the 9 types of soil. The contamination method and the test conditions were modified to minimize the impact of that factor. In the toxicological assays to create the prediction model, all the soils will be contaminated by 135 mg/kg, the  $LC_{50}$  of fluorene.

Another preliminary experiment was then performed to validate the methodology by determining if the same concentration of fluorene (110 mg/kg) can induce toxicity differences for the worms in 5 of the 9 types of soil. Results confirmed the importance of clay, and especially organic matter on the toxicity of fluorene to the worms. No mortality occurred in a soil containing 5 % of organic matter whereas all the worms died within 7 days in a soil with a 0.5% organic matter content. Moreover, 2 soils with the same organic matter content (0.5%) but 5 and 30 % of clay showed very different toxic responses. In the first case, all the worms died within 7 days whereas in the second case, 45 % were still alive after 14 days of exposure. The literature dealing with the effects of organic matter and clay content on the toxicity of organic contaminants does not display such marked effects.

These results confirm that the 9 different types of soil have very different adsorptive properties that have a clear effect on the bioavailability of fluorene. Because of the very sensitive responses of worms, fluorene represents an excellent contaminant for the elaboration of a prediction model. These results also indicate the urgency to consider soil composition in risk analysis.

# TABLE DES MATIÈRES

<b>REMERCIEMENTS.....</b>	<b>IV</b>
<b>RÉSUMÉ.....</b>	<b>V</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>VIII</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES.....</b>	<b>XI</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX.....</b>	<b>XIV</b>
<b>LISTE DES FIGURES.....</b>	<b>XVI</b>
<b>LISTE DES ANNEXES.....</b>	<b>XVIII</b>
<b>LISTE DES SIGLES ET ABBRÉVIATIONS.....</b>	<b>XIX</b>
 <b>INTRODUCTION .....</b>	 <b>1</b>
<b>CHAPITRE I: REVUE DE LITTÉRATURE.....</b>	<b>4</b>
1.1 Hydrocarbures aromatiques polycycliques .....	5
1.1.1 Sources des HAP.....	6
1.1.2 Propriétés des HAP .....	7
1.2 Propriétés des sols.....	9
1.2.1 Texture et porosité .....	9
1.2.2 Composantes du sol.....	10
1.3 Interactions des HAP avec le sol.....	14
1.3.1 Caractéristiques du contaminant.....	15
1.3.2 Caractéristiques du sol.....	15
1.3.3 Caractéristiques de la contamination .....	22
1.4 Biodisponibilité .....	24



1.5 Ecotoxicologie.....	25
1.5.1 Mesure de la toxicité .....	26
1.5.2 Tests avec ver de terre.....	27
1.5.3 Tests avec plantes.....	33
1.6 Conclusion .....	37

## **CHAPITRE II: OBJECTIFS ET MÉTHODOLOGIE GÉNÉRALE DU PROJET 38**

2.1 Hypothèse de recherche et objectifs.....	39
2.2 Méthodologie générale.....	40
2.2.1 Facteurs influençant la réponse toxique .....	42
2.2.2 Plan méthodologique du projet .....	47

## **CHAPITRE III: SÉLECTION DES SOLS ..... 49**

3.1 Matériel et méthodes .....	50
3.1.1 Détermination du nombre et de la composition des sols.....	50
3.1.2 Choix de la nature des composants .....	55
3.1.3 Préparation des sols.....	59
3.1.4 Caractérisation physico-chimique des sols .....	59
3.1.5 Détermination de l'influence de la matrice de sol sur les organismes des tests de toxicité.....	61
3.2 Résultats et discussion .....	64
3.2.1 Nombre et composition des sols .....	64
3.2.2 Caractéristiques des composants purs.....	66
3.2.3 Caractéristiques physico-chimiques des 9 types de sol.....	69
3.2.4 Influence de la matrice de sol sur les organismes des tests de toxicité.....	75
3.3 Conclusion .....	77

<b>CHAPITRE IV: SÉLECTION DU CONTAMINANT.....</b>	<b>78</b>
4.1 Matériel et méthodes .....	79
4.1.1 Choix du solvant .....	82
4.1.2 Évaluation de la toxicité des HAP et du solvant.....	83
4.1.3 Évaluation de la volatilité des HAP et du solvant.....	87
4.2 Résultats et discussion .....	90
4.2.1 Caractérisation du solvant .....	90
4.2.2 Toxicité des HAP .....	92
4.2.3 Volatilité des HAP .....	104
4.2.4 Bilan .....	107
4.2.5 Fluorène: nouvelles conditions .....	108
4.3 Conclusion .....	111
 <b>CHAPITRE V: VALIDATION DE LA MÉTHODOLOGIE.....</b>	 <b>114</b>
5.1 Matériel et méthodes .....	115
5.2 Résultats et discussion .....	116
5.3 Conclusion .....	119
 <b>CONCLUSION GÉNÉRALE .....</b>	 <b>120</b>
<b>RECOMMANDATIONS GÉNÉRALES.....</b>	<b>122</b>
<b>RÉFÉRENCES.....</b>	<b>124</b>

# LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1: Propriétés physico-chimiques de quelques HAP .....	8
Tableau 1.2: Systèmes de classification des sols .....	10
Tableau 1.3: Caractéristiques des argiles .....	13
Tableau 1.4: Exemples d'observations d'adsorption lente.....	23
Tableau 1.5: Types de plantes recommandées pour la réalisation des tests de toxicité....	34
Tableau 3.1: Contraintes sur le contenu de chaque composant dans les sols.....	53
Tableau 3.2: Composition chimique de la kaolinite.....	58
Tableau 3.3: Nombre de réplicats pour chaque essai de caractérisation des sols .....	60
Tableau 3.4: Comparaison entre les concentrations en métaux dans le sol LG2 et les NOEC pour les vers de terre.....	67
Tableau 3.5: pH, teneur en eau et capacité de rétention des 9 types de sol.....	69
Tableau 3.6: Surfaces spécifiques des composants purs .....	74
Tableau 4.1: Caractéristiques du contaminant choisi.....	79
Tableau 4.2: Critères quantitatifs pour caractériser les contaminants.....	80
Tableau 4.3: Caractéristiques chimiques des 4 HAP étudiés .....	81
Tableau 4.4: Protocoles expérimentaux des essais de toxicité.....	87
Tableau 4.5: Germination et croissance de l'orge <i>H. vulgare</i> dans le sol 5 avec et sans acétone .....	90
Tableau 4.6: Variation pondérale du ver <i>E. foetida</i> dans le sol 5 avec et sans acétone ...	91
Tableau 4.7: Concentrations résiduelles d'acétone dans le sol 5 .....	91
Tableau 4.8: Concentrations de fluorène dans le sol 5 après une période de volatilisation du solvant de 18 heures .....	104
Tableau 4.9: Concentrations du phénanthrène dans le sol 5 après une période de volatilisation du solvant de 1h30 .....	105

Tableau 4.10: Concentrations de phénanthrène dans le sol 5 en fonction de diverses méthodes de contamination.....	106
Tableau 4.11: Bilan des caractéristiques des 4 HAP testés.....	107
Tableau 4.12: Comparaison de la mortalité du ver <i>E. foetida</i> pour les 2 essais sur le fluorène .....	110
Tableau 4.13: Concentrations de fluorène des 2, 5 et 8 après contamination sur sol hydraté et 1h30 de volatilisation du solvant .....	111

# LISTE DES FIGURES

Figure 1.1: Structure moléculaire de certains HAP classés prioritaires par l'EPA.....	5
Figure 1.2: Répartition des sources de HAP dans l'environnement.....	6
Figure 1.3: Orientation des molécules d'eau à proximité des surfaces minérales .....	12
Figure 1.4: Facteurs affectant l'adsorption des composés non polaires.....	15
Figure 1.5: Relation entre le contenu en matière organique du sol et la concentration du phénanthrène dans la phase aqueuse.....	17
Figure 1.6: Mécanismes de préhension et d'excrétion des contaminants par le ver de terre.....	31
Figure 2.1: Méthodologie pour l'élaboration d'un modèle prédictif .....	41
Figure 2.2: Principaux facteurs influençant la toxicité d'un contaminant dans un sol .....	42
Figure 2.3: Plan méthodologique du projet.....	48
Figure 3.1: Exemples de points expérimentaux avec et sans contraintes.....	51
Figure 3.2: Espace expérimental .....	54
Figure 3.3: Compositions des différents types de sol .....	65
Figure 3.4: Granulométrie du sol LG2.....	66
Figure 3.5: Granulométrie du sable séparé mécaniquement du sol LG2 .....	68
Figure 3.6: Porosité des sols 2, 5 et 8.....	71
Figure 3.7: Surface spécifique des 9 types de sol mesurée par BET et porosimétrie .....	73
Figure 3.8: Germination et croissance de l'orge <i>H. vulgare</i> dans les 9 types de sol non contaminés. ....	75
Figure 3.9: Perte de poids des vers <i>E. foetida</i> dans les 9 types de sol non contaminés. ....	76
Figure 4.1: Étapes de l'expérimentation pour évaluer la toxicité des HAP .....	83
Figure 4.2: Germination et croissance de l'orge <i>H. vulgare</i> en fonction de la concentration de pyrène dans le sol 5. ....	92

Figure 4.3: Germination et croissance de l'orge <i>H. vulgare</i> en fonction de la concentration de phénanthrène dans le sol 5 .....	93
Figure 4.4: Croissance racinaire de l'orge <i>H. vulgare</i> en fonction de la concentration d'acénaphthène dans le sol 5 .....	95
Figure 4.5: Germination et croissance du cresson <i>L. sativum</i> en fonction de la concentration de phénanthrène dans le sol 5 .....	97
Figure 4.6: Mortalité du ver <i>E. foetida</i> à 7 et 14 jours en fonction de la concentration de fluorène dans le sol 5 .....	98
Figure 4.7: Mortalité du ver <i>E. foetida</i> à 7 et 14 jours en fonction de la concentration d'acénaphthène dans le sol 5 .....	99
Figure 4.8: Variation pondérale du ver <i>E. foetida</i> en fonction de la concentration d'acénaphthène dans le sol 5 .....	99
Figure 4.9: Mortalité du ver <i>E. foetida</i> à 7 et 14 jours en fonction de la concentration en pyrène dans le sol 5 .....	100
Figure 4.10: Mortalité du ver <i>E. foetida</i> à 7 et 14 jours en fonction de la concentration en phénanthrène dans le sol 5 .....	101
Figure 4.11: Mortalité du ver <i>E. foetida</i> à 7 et 14 jours en fonction de la concentration en fluorène dans le sol 5: deuxième essai. ....	109
Figure 5.1: Mortalité du ver <i>E. foetida</i> à 7 et 14 jours dans les sols 1, 3, 5, 7 et 9 contaminés par 110 mg/kg de fluorène.. ....	116
Figure 5.2: Variation pondérale à 14 jours du ver <i>E. foetida</i> dans les sols.1, 3, 5, 7, et 9.....	118

## LISTE DES ANNEXES

ANNEXE A: Protocoles de caractérisation des sols .....	136
ANNEXE B: Contenu en métaux des composants purs .....	140
ANNEXE C: Préparation des sols.....	143
ANNEXE D: Protocole du test de germination et croissance du cresson <i>Lepidium sativum</i> .....	146
ANNEXE E: Contamination des sols et tests de toxicité.....	148
ANNEXE F: Capacité de rétention et hydratation des sols .....	162
ANNEXE G: Analyses chimiques .....	166
ANNEXE H: Résultats des essais préliminaires .....	170

## LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

ADN	: Acide désoxyribonucléique
ASTM	: American Society for Testing and Materials
BET	: Brunautt, Elmett et Teller
CEC	: capacité d'échange cationique
CE <sub>50</sub>	: concentration engendrant 50 % des effets ciblés
CI <sub>50</sub>	: concentration engendrant 50 % d'inhibition de l'effet ciblé
CL <sub>50</sub>	: concentration causant 50% de létalité des organismes cibles
EPA	: US- Environmental Protection Agency
ET	: écart-type
FDA	: Food and Drug Administration
HAP	: hydrocarbures aromatiques polycycliques
K <sub>d</sub>	: coefficient de distribution d'un contaminant dans le sol
K <sub>oc</sub>	: coefficient de partition dans le carbone organique
K <sub>ow</sub>	: coefficient de partition octanol:eau
K <sub>mo</sub>	: coefficient de partition d'un contaminant dans la matière organique
MEF	: Ministère de l'environnement et de la faune du Québec
MTI	: Massachussetts Technology Institute
n	: nombre de réplicats
OCDE	: Organisation de Coopération et de Développement International
PE	: protocole expérimental
USDA	: US Department of Agriculture



# INTRODUCTION

Avant la mise en vigueur de la nouvelle *Politique de protection des sols et de réhabilitation des terrains contaminés* (MEF,1998), le propriétaire d'un site à décontaminer situé au Québec ne disposait que d'une seule option de gestion. Selon l'usage futur du terrain, il devait atteindre les critères A, B ou C, uniquement basés sur la concentration de contaminant dans le sol. Or, cette approche fait abstraction, de l'ensemble des facteurs pouvant modifier le risque et le potentiel de biorestauration associés à une contamination spécifique dans des conditions environnementales précises. Par exemple, bien que certains sols sablonneux contaminés par des produits pétroliers puissent être restaurés jusqu'au niveau de concentration désiré avec un procédé économiquement rentable, les sols riches en argile ou en matière organique ne peuvent être décontaminés au niveau fixé. Environ 20 à 40 % de la contamination demeure après le traitement et n'est que très lentement dégradée par la suite (Geerdink *et al.*, 1996).

Une nouvelle approche se démarque depuis quelques années dans le domaine des sols contaminés. Les échecs de restauration de certains sites, une meilleure compréhension des mécanismes de migration des contaminants et surtout, les coûts énormes des efforts de décontamination incitent de plus en plus les industriels, les consultants et les administrateurs à substituer une approche basée sur le risque à l'approche traditionnelle de gestion par critères génériques.

Pour tenir compte de l'analyse de risque comme mode de gestion, le MEF a récemment entériné une nouvelle approche de gestion d'un sol contaminé qui stipule que:

“le propriétaire d'un terrain peut évaluer le risque spécifique que constitue son terrain, de façon à confirmer ou infirmer l'existence d'un impact ou d'un risque significatif. Pour ce faire, il doit tenir compte du risque toxicologique, du risque écotoxicologique, et de l'impact sur les eaux souterraines du terrain.”

À partir des résultats obtenus, des mesures de mitigations seront prises conjointement avec le MEF (MEF, 1998). L'évaluation du risque écotoxicologique énoncée dans la citation ci-dessus repose entre autres sur la collecte de données de toxicité publiées dans la littérature (analyse de risque préliminaire ou qualitative) ou obtenues à partir d'essais spécifiques (analyse de risque quantitative). Dans le premier cas, ces données peuvent toutefois être empreintes d'une grande imprécision car elles dépendent énormément des conditions dans lesquelles elles ont été obtenues, principalement de la composition du sol.

Quelques études ont été effectuées pour modéliser l'influence des caractéristiques du sol sur la toxicité de contaminants organiques (phénols, fongicides) (Lofs-Holmin, 1980 ; van Gestel *et al.*, 1991a). Cependant, bien que certaines semblent démontrer que la toxicité de ces derniers soit principalement reliée au contenu en argile et surtout, à celui en matière organique, cette influence demeure fort peu étudiée dans le cas de composés organiques non polaires. Selon Alexander (1995), la relation entre le type de sol et la toxicité est complexe, et les données actuelles disponibles ne permettent pas d'établir un tel lien de manière rigoureuse.

À l'automne 1999, le MEF a l'intention de valider tous les critères génériques de la nouvelle politique de gestion et définira, si nécessaire, les nouveaux critères qui seront utilisés à l'avenir. En plus de faciliter grandement l'application des analyses de risque écotoxicologique, une meilleure compréhension de l'influence de la composition du sol

sur la toxicité d'un contaminant organique non polaire permettrait d'établir des critères génériques plus appropriés. Dans ces deux approches de gestion (critères génériques et analyse de risque), une étude exhaustive de cette influence faciliterait donc le processus décisionnel des gestionnaires qui serait basé sur une meilleure connaissance du danger réel associé à la présence d'un contaminant organique dans un sol.

Après une revue de la littérature sur les facteurs du sol influençant la biodisponibilité des HAP (le modèle de contaminant non polaire utilisé dans le projet), ce mémoire présente les 4 étapes expérimentales du projet, chacune constituant un chapitre distinct. La première vise à développer un plan méthodologique tenant compte de l'ensemble des facteurs pouvant influencer la réponse toxique du contaminant. Les deux étapes suivantes traitent du choix et de la caractérisation des sols et du contaminant. Enfin, la méthode développée est validée au cours d'un essai préparatoire présenté au chapitre 5.

# **CHAPITRE I**

## **REVUE DE LITTÉRATURE**

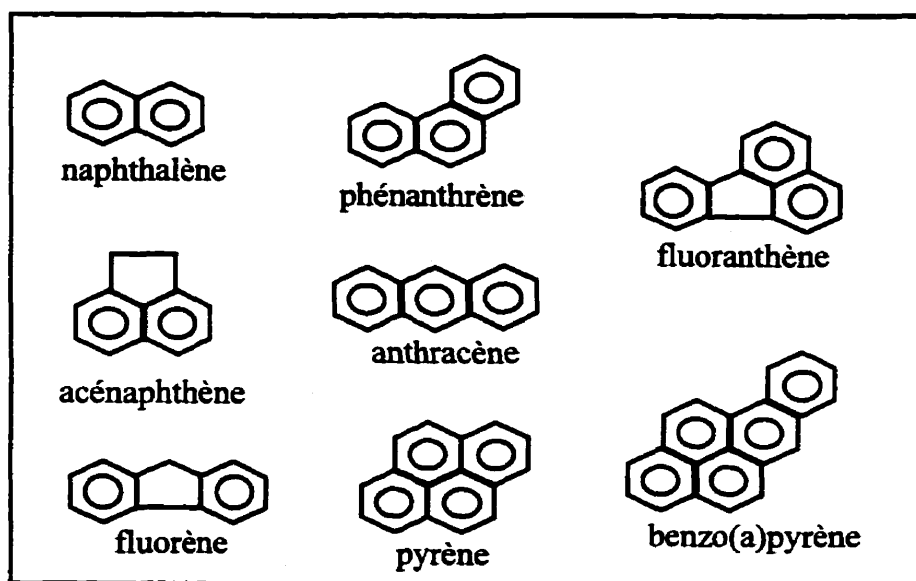
*La revue de littérature présentée dans ce chapitre résume les éléments clefs permettant la compréhension des phénomènes impliqués dans la biodisponibilité et la toxicité d'un hydrocarbure aromatique polycyclique (HAP) présent dans un sol.*

*Elle explore en premier lieu les caractéristiques des sols et des HAP de façon générale pour ensuite s'intéresser aux phénomènes qui régissent les interactions entre ces deux composants. Le concept de biodisponibilité et les méthodes utilisées pour la quantifier sont ensuite décrits.*

## 1.1 HYDROCARBURES AROMATIQUES POLYCYCLIQUES

Depuis une quinzaine d'années, les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) constituent une classe de contaminants qui suscite un grand intérêt dans la communauté scientifique. Cet intérêt est principalement imputable aux propriétés toxiques induisant des effets cancérigènes, mutagènes et tératogènes de certains HAP chez les animaux, et aussi chez les humains (Alloway et Ayres, 1993).

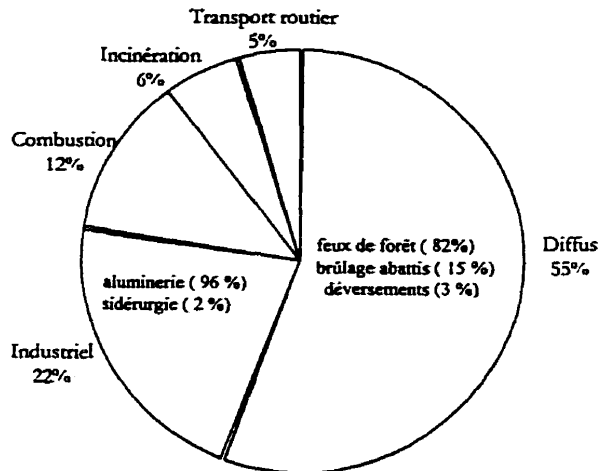
Les HAP forment une famille de substances organiques composées uniquement d'atomes de carbone et d'hydrogène structurés en deux ou plusieurs noyaux benzéniques. Parmi la centaine de HAP dénombrés à ce jour, 16 sont classés prioritaires par l'Agence américaine de protection de l'environnement (U.S. EPA) et 17 par la *Loi canadienne sur la protection de l'Environnement* à cause de leurs effets toxiques et de leur persistance dans l'environnement. La figure 1.1 en illustre quelques-uns.



**Figure 1.1 : Structure moléculaire de certains HAP classés prioritaires par l'EPA**

### 1.1.1 Sources des HAP

Les HAP sont souvent émis et retrouvés dans l'environnement sous forme de mélanges complexes. Ils proviennent de la combustion incomplète du bois, du charbon, de l'huile, du gaz et de déchets (ATSDR, 1990). De plus, la fumée de cigarette et diverses méthodes de cuisson constituent des modes importants d'exposition individuelle (Comeau, 1997). Des facteurs comme le type et la quantité de combustible, la température et la durée de la combustion, ainsi que la disponibilité de l'oxygène déterminent la nature et l'importance des HAP formés (Environnement Canada, 1994). De très faibles quantités peuvent également être produites par diagénèse ou biosynthèse (Environnement Canada, 1994). La figure 1.2 montre que malgré l'importante quantité de HAP produite par l'activité anthropogénique, les feux de forêt constituent la principale source d'émission de ces contaminants.



**Figure 1.2: Répartition des sources de HAP dans l'environnement (Environnement Canada, 1993 a et b)**

Les rejets liquides de HAP proviennent principalement du traitement du bois à la créosote, mélange composé à 85 % de HAP (Wilson et Jones, 1993) ou encore de déversements de produits pétroliers (Environnement Canada, 1993a). Les concentrations naturelles de HAP dans les sols varient de 5 à 1000 µg/kg dans les forêts et de 1000 à 3000 µg/kg dans les villes (Menzie *et al.*, 1992).

### 1.1.2 Propriétés des HAP

À l'état pur et à température ambiante, les HAP sont des solides peu colorés et cristallins. Leurs propriétés physiques, présentées au tableau 1.1, varient beaucoup selon leur masse et leur structure. Sauf dans le cas du naphthalène, les solubilités dans l'eau sont relativement faibles et les tensions de vapeur faibles à modérément élevées. Les coefficients de partage octanol-eau ( $K_{ow}$ ) sont élevés, ce qui dénote un important potentiel d'adsorption et de bioconcentration dans les organismes.

Les HAP peuvent pénétrer dans les organismes vivants par inhalation de l'air pollué ou de fumée, par contact dermique avec de la suie, du goudron ou des huiles minérales, ou encore par ingestion d'eau ou d'aliments contaminés (Saucier, 1988). Leur principal effet toxique est la cancérogénèse, une propriété qui se manifeste lorsque les HAP contiennent plus de 4 anneaux aromatiques (Saucier, 1988). Plusieurs HAP ont causé des tumeurs sur des animaux et des humains exposés pour une longue période de temps à ces contaminants peuvent également développer des cancers (ASTDR, 1990). La mutagénèse et la tératogénèse sont également des manifestations importantes de leur toxicité (CNRC, 1985), et des études sur les animaux ont montré que les HAP peuvent avoir des effets sur la peau et le système immunitaire (ASTDR, 1990). Bien qu'aucun potentiel cancérigène n'ait été observé pour plusieurs HAP (phénanthrène, fluorène, acénaphthène, pyrène), ces derniers peuvent également s'avérer toxiques. Par exemple, le fluorène et le phénanthrène sont toxiques pour le polychète *Neanthes arenaceodentata* (Rossi et

Neff, 1978) alors que l'acénaphthène et le fluorène engendrent la mortalité des vers *Eisenia foetida* à des concentrations inférieures à 200 mg/kg de sol (Neuhauser *et al.*, 1985).

**Tableau 1.1: Propriétés physico-chimiques de quelques HAP**

HAP	Masse molaire	Solubilité dans l'eau (mg/l)	Tension de vapeur (mmHG)	log K <sub>ow</sub>	log K <sub>oc</sub>
Naphtalène	128.16	31.7 (1,2)	31 (2)	3,5 (1) 3,30 (2)	3,11 (2)
Acénaphthène	154.21	3,42 (1) 3,88 (2)	2,31 E-2 (2)	4,33 (1) 3,92 (2)	3,7 (2)
Fluorène	166.23	1,98 (1) 1,90 (2)	6,67 E-4 (2)	4,18 (1,2)	3,9 (2)
Phénanthrène	178.24	1,29 (1) 1,18 (2)	2,01 E-4 (2)	4,5 (1,2)	4,1 (2)
Anthracène	178.24	0,045 (1) 0,075 (2)	1,08 E-5 (2)	4,5 (1,2)	4,1 (2)
Fluoranthène	202.26	0,26 (1,2)	1,00 E-6 (2)	5,1 (1) 4,9 (2)	4,58 (2)
Pyrène	202.26	0,135 (1) 0,148 (2)	6,67 E-6 (2)	4,9 (1,2)	4,58 (2)
Chrysène	202.26	0,006 (2)	6,3 E-9 (2)	5,61 (2)	5,3 (2)
Benzo(a)pyrène	252.32	0,0038 (1,2)	5,49 E-9 (2)	6,0 (1,2)	6,74 (2)

(1) Environnement Canada (1993c)

(2) EPA (1991)

La biodégradation des HAP est limitée par leur faible solubilité. De façon générale, les HAP de 2 ou 3 anneaux, plus solubles, sont rapidement biodégradés alors que ceux de 4 anneaux et plus sont récalcitrants (Cerniglia, 1993).



## **1.2 PROPRIÉTÉS DES SOLS**

Les sols constituent un support pour de nombreuses activités humaines, autant agricoles, urbaines, industrielles que récréatives. Formés d'agrégats de minéraux et de particules organiques, ils sont continuellement modifiés par les processus chimiques, physiques et biologiques qui y règnent. L'ensemble des sols est dénommé «pédosphère» et la science qui s'intéresse à la morphologie et aux constituants du sol, la «pédologie». L'examen du profil d'un sol révèle la présence de couches horizontales nommées «horizons». Chaque horizon possède ses propres caractéristiques: couleur, texture, structure et porosité, composition, densité, pH, capacité d'échange cationique et fraction de carbone organique (Duchaufour, 1965).

Cette section s'intéresse aux principales caractéristiques des sols influençant l'adsorption d'un contaminant organique, soient la texture et la porosité, la nature des composants, et enfin, les caractéristiques chimiques.

### **1.2.1 Texture et porosité**

La texture d'un sol influence la circulation de l'eau, la capacité de rétention ainsi que l'adsorption des contaminants. Elle est déterminée par les quantités relatives de sable, d'argile et de limon contenues dans le sol (Foth, 1990). Plusieurs normes, dont celles présentées au tableau 1.2, définissent la taille de ces composants.

**Tableau 1.2: Systèmes de classification des sols**

	<b>Argile</b>	<b>Limon</b>	<b>Sable</b>
US Department of Agriculture (USDA)	$< 2 \mu\text{m}$	$2 \mu\text{m} - 50 \mu\text{m}$	$50 \mu\text{m} - 2 \text{mm}$
Unified Soil Classification System (ASTM)	fines (argile ou limon) $< 75 \mu\text{m}$		$75 \mu\text{m} - 2 \text{mm}$
Massachusetts Institute of Technology	$< 2 \mu\text{m}$	$2 \mu\text{m} - 63 \mu\text{m}$	$63 \mu\text{m} - 2 \text{mm}$

Adapté de Winegardner (1996)

La porosité se définit comme la portion d'un sol qui n'est pas occupée par de la matière solide. Elle dépend de la forme et de l'arrangement des particules de sol, de la texture et de la compacité (Todd, 1980). Il existe 3 classes de pores, distinguées par leur taille: les macropores ( $D > 500 \text{ \AA}$ ), les mésopores ( $20 \text{ \AA} < D < 500 \text{ \AA}$ ) et les micropores ( $D < 20 \text{ \AA}$ ) (Farrel et Reinhard, 1994).

## 1.2.2 Composantes du sol

Le sol est composé de fractions inorganique et organique dans des proportions qui varient fortement. Chacune de ces fractions, dont les principales caractéristiques sont détaillées dans cette section, influence le devenir d'un contaminant.

### 1.2.2.1 Composante organique

La matière organique du sol est constituée d'une accumulation de plantes, de résidus d'animaux partiellement décomposés, ainsi que de composés synthétisés par les organismes du sol. Elle contient des biopolymères (protéines, lignine, cellulose), mais aussi une multitude de macromolécules provenant de réactions photochimiques ou de la dégradation partielle de résidus organiques. Les matières humiques (acides humiques, fulviques et humins) constituent de 60 à 70 % de la matière organique. Elles sont

lipophiles, acides, partiellement aromatiques et possèdent une structure chimique très complexe (Stvenson, 1982). Elles ont une importante capacité d'échange cationique et des surfaces spécifiques très élevées (500 à 800 m<sup>2</sup>/g) (Bower et Gshwend, 1952). Le reste de la matière organique est principalement composé de polysaccharides et de substances protéiniques relativement biodégradables comparativement aux matières humiques (Comeau, 1997).

Continuellement transformée par les micro-organismes du sol, la matière organique est considérée comme un composé transitoire dont la composition change avec le temps. Sa structure et sa composition dépendent également des constituants fournis par les organismes vivants dans le sol en question et de l'origine géographique (Gauthier *et al.*, 1987).

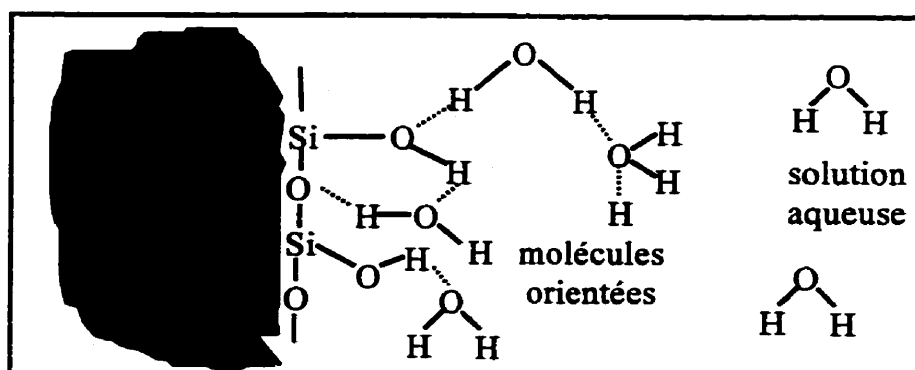
La matière organique existe sous forme de polymères linéaires qui s'entrecroisent en créant un réseau dont le volume est modifié par le pH et la force ionique de l'eau (Oades, 1989; Stevenson et Schnitzer, 1982). Elle est présente dans les sols sous forme de particules colloïdales ou comme film sur les surfaces minérales, de 30 à 1000 nm d'épaisseur (Pignatello et Xing, 1996). La quantité totale de matière organique dans les sols varie largement. Exception faite de la tourbe, les sols de surface en contiennent moins de 15 % massique et la plupart, moins de 2 % (Fall, 1995).

#### **1.2.2.2 Composante inorganique**

La fraction minérale du sol constitue 40 à 50 % de son volume total (Winegardner, 1996). Les minéraux peuvent être séparés en 2 classes, primaire et secondaire. Les premiers, hérités de la roche mère, comprennent le quartz, le feldspath et le mica. Le sable et le limon sont principalement composés de ces minéraux (Foth, 1990; Robert et Chenu, 1992; Winegardner, 1996). L'argile provient des matériaux secondaires obtenus par

météorisation et transformation des matériaux primaires (Winegardner, 1996). Les éléments les plus abondants de la croûte terrestre étant l'oxygène (46.6%) et le silicium (27.7 %) (Foth, 1990), plusieurs types d'argile sont constitués de tétraèdres silicium:oxygène dans lesquels le silicium a une valence +4 et l'oxygène, -2. La substitution d'un ion  $\text{Al}^{3+}$  ou  $\text{Fe}^{3+}$  à l'atome de silicium est dénommée substitution isomorphe. La nature des substitutions et l'arrangement des tétraèdres déterminent le type d'argile (ex.: kaolinite, montmorillonite, vermiculite) (Fall, 1995).

Les substitutions isomorphiques entraînent la formation de charges électriques sur les surfaces minérales. L'équilibre est rétabli par la présence de cations ou de liaisons avec les molécules en solution. Ceci amène l'orientation des molécules d'eau à proximité de la surface (voir figure 1.3), mais aussi l'une des caractéristiques fondamentales de l'argile: sa capacité d'échange cationique (CEC). Cette dernière se définit comme la quantité totale de cations pouvant être adsorbée par les surfaces chargées négativement et représente donc la capacité du sol à attirer et accumuler les cations. La plupart des argiles possèdent des charges négatives, mais certaines possèdent des charges variables ou positives donnant lieu à une capacité d'échange anionique (CEA). Les sols chargés négativement sont généralement caractéristiques des régions tempérées et ceux à charges variables, des régions tropicales (Robert et Chenu, 1992).



**Figure 1.3: Orientation des molécules d'eau à proximité des surfaces minérales**

Outre leur capacité de rétention d'eau élevée, les argiles sont caractérisées par une grande surface spécifique. Certains types d'argile ont des surfaces internes leur donnant la propriété de se gonfler en présence d'eau (ex.: montmorillonite) (Comeau, 1997). Le tableau 1.3 présente les principales caractéristiques des argiles les plus communes.

**Tableau 1.3: Caractéristiques des argiles**

Type d'argile	Capacité d'échange cationique (mEq/100 g)	Surface spécifique (m <sup>2</sup> /g)	Type de charge
Kaolinite	1-20	<30 ext *	variables
Illite	10-40	50-100 ext + int **	permanentes (-)
Chlorite	1-20	10-200 ext	permanentes (-)
Vermiculite	130-180	800 int	permanentes (-)
tiré de Robert et Chenu (1992)		** int: surfaces internes	
*tiré de Todd (1980)		ext: surfaces externes	

### 1.2.2.3 Caractéristiques chimiques

Le pH des sols est généralement compris entre 4 et 10 (Foth, 1990). Dans cet intervalle, il dépend de la matière organique et de la nature des cations présents (Foth, 1990; Sposito, 1989). Ainsi, le pH est d'autant plus faible que le contenu en matière organique est élevé (Fall, 1995).

L'eau du sol est considérée comme un électrolyte faible, composé d'une variété d'anions de différentes valences ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ). La quantité de ces anions varie énormément en fonction du type de sol (Babich et Stotzky, 1983). La force ionique de l'eau (I) est définie comme la somme, en tenant compte de leur valence, de toutes les espèces chargées dans une solution (Sposito, 1989).

### 1.3 INTERACTIONS DES HAP AVEC LE SOL

Un contaminant présent dans le sol peut se retrouver sous plusieurs formes : dissous dans l'eau, volatilisé dans l'air, adsorbé aux particules minérales et organiques ou encore, dans une phase libre. Les propriétés intrinsèques du contaminant déterminent la phase prédominante dans laquelle il se retrouve.

Les molécules non polaires, telles que les HAP, sont relativement peu solubles dans l'eau. En effet, leur dissolution implique une modification des liaisons hydrogène formées par les molécules d'eau environnantes, une opération énergétiquement défavorable (Shwarzenbach *et al.*, 1993). Cette faible solubilité favorise donc leur adsorption sur la matrice solide. À faible concentration de contaminant, un équilibre d'adsorption/désorption peut être représenté par une isotherme d'adsorption linéaire définie par l'équation suivante:

$$S = K_d C_e \quad (1.1)$$

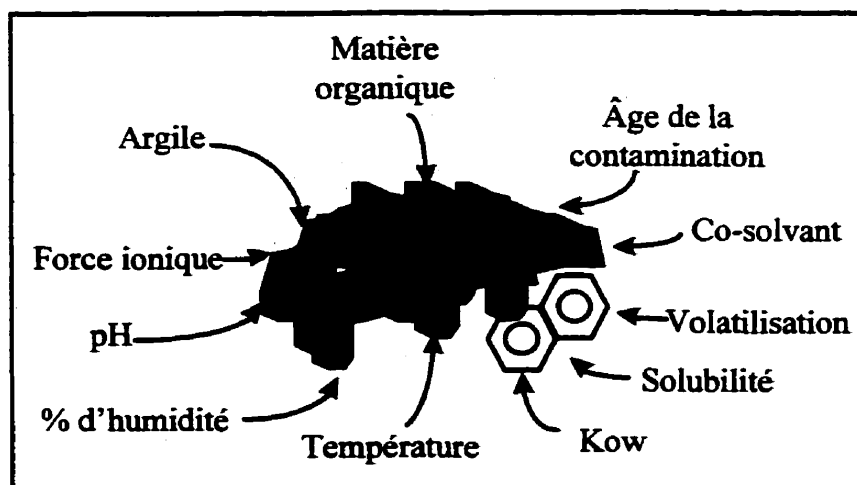
où  $S$  est la masse de contaminant adsorbée par masse de sol à l'équilibre,  $C_e$  la concentration de contaminant dans la phase aqueuse et  $K_d$  le coefficient de distribution entre les phases solide et liquide (Ramaswami et Luthy, 1997). Ce coefficient de distribution s'exprime également de la façon suivante:

$$K_d = \frac{C_{mo} * f_{mo} + C_{min} * A}{C_e} \quad (1.2)$$

où

$C_{mo}$	est la concentration associée à la matière organique (mol /kg mo)
$f_{mo}$	est la fraction massique de matière organique du sol (kg mo/ kg sol)
$C_{min}$	est la concentration associée avec la surface minérale du sol (mol/m <sup>2</sup> )
$A$	est la surface spécifique du sol par kg de solide (m <sup>2</sup> /kg)

Les caractéristiques du contaminant, celles du sol et les conditions de la contamination peuvent influencer le coefficient de distribution (voir figure 1.4). Les prochaines sections décrivent l'influence de ces facteurs et l'état des recherches à leur sujet.



**Figure 1.4: Facteurs affectant l'adsorption des composés non polaires**

### 1.3.1 Caractéristiques du contaminant

Les propriétés intrinsèques d'un contaminant ont une influence prépondérante sur son devenir dans un sol. Ainsi, une grande volatilité favorise le déplacement vers le compartiment aérien. Un composé soluble aura également tendance à se dissoudre et à être plus facilement lixivié ou biodégradé. Enfin, un contaminant avec un coefficient octanol-eau ( $K_{ow}$ ) élevé s'adsorbera sur le sol ce qui limitera sa biodégradation.

### 1.3.2 Caractéristiques du sol

Le contenu en argile, et surtout celui en matière organique, sont les principales caractéristiques pédologiques influençant le devenir d'un contaminant non polaire. Bien que ceux-ci soient moins affectés que les composés ionisables par les caractéristiques

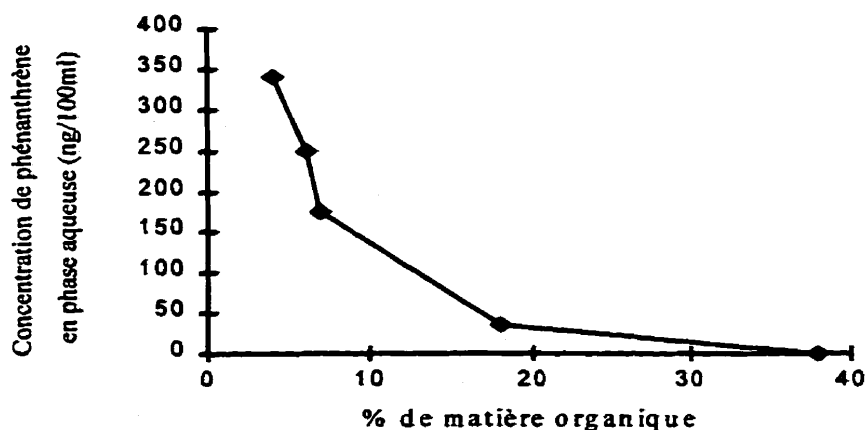
chimiques du sol, l'influence de ces dernières est également brièvement discutée dans cette section.

### **1.3.2.1 Matière organique**

Grâce à sa faible polarité par rapport à celle de l'eau, la matière organique a une influence primordiale sur la disparition des contaminants de la phase aqueuse (Chiou, 1990; Farrel et Reinhard, 1994; Mader *et al.*, 1997; Manilal et Alexander, 1991; Means *et al.*, 1980). En effet, composée de macromolécules poreuses et flexibles, elle ne peut être impliquée qu'en certains endroits de sa structure avec des liaisons hydrogène. Elle constitue donc un environnement relativement non polaire, dans lequel un composé hydrophobe peut se dissoudre et former des interactions moléculaires relativement faibles. Cette dissolution peut se comparer à une dissolution dans un solvant organique (Schwarzenbach *et al.*, 1993). Les termes absorption et partition sont d'ailleurs souvent utilisés pour décrire l'interaction entre la matière organique et les contaminants (Chiou, 1990; Pignatello et Xing, 1996).

Plusieurs études ont établi une corrélation directe entre la quantité de matière organique et la diminution de concentration d'un contaminant en phase aqueuse (Chiou, 1990; Farrel et Reinhard, 1994; Manilal et Alexander, 1991). La figure 1.5 en présente un exemple.





**Figure 1.5: Relation entre le contenu en matière organique du sol et la concentration du phénanthrène dans la phase aqueuse (adapté de Manilal et Alexander, 1991)**

Étant donné l'importance des interactions avec la matière organique, un coefficient de partition a été défini tel que:

$$K_{mo} = C_{mo}/C_{eau} \quad (1.3)$$

Comme il est communément accepté que la matière organique constitue l'effet principal, l'équation 1.2 peut se simplifier de la façon suivante:

$$\begin{aligned} K_d &= f_{mo} * C_{mo}/C_e \\ K_d &= f_{mo} * K_{mo} \end{aligned} \quad (1.4)$$

L'équilibre de partition est donc directement proportionnel à la quantité de matière organique ( $f_{mo}$ ), à ses caractéristiques ainsi qu'à celles du contaminant ( $K_{mo}$ ). La quantité de matière organique présente dans un sol s'exprime également en fonction de la quantité de carbone organique ( $co$ ), et comme la matière organique contient environ 50 % de carbone,  $f_{mo} = 2 f_{co}$  et  $K_{co} = 2 K_{mo}$  (Schwarzenbach *et al.*, 1993).

Tel que mentionné précédemment, le phénomène de dissolution dans la matière organique peut être comparé à la dissolution du contaminant dans un solvant organique. Le  $K_{mo}$  peut donc être estimé à l'aide du coefficient de partition octanol-eau d'une substance ( $K_{ow}$ ). Quelques relations concernant les HAP ont d'ailleurs été développées par certains auteurs (Chiou, 1998; Karickhoff, 1981).

La composition de la matière organique peut avoir une influence sur la partition des contaminants. Gauthier *et al.* (1987) ont déterminé que les coefficients de partition ( $K_{co}$ ) du pyrène évalués avec 14 types de substances humiques pouvaient varier d'un facteur 10 selon le type de substance utilisé. De plus, le  $K_{co}$  était significativement influencé par le degré d'aromaticité des matières humiques, caractérisé par un rapport C/H élevé. Une étude menée par Rutherford *et al.* (1992) a également mis en évidence qu'une matière organique relativement non polaire (faible rapport N+O/C) favorise la partition des contaminants dans la matière organique. Cependant, une étude exhaustive menée par Kile *et al.* (1995) sur 22 types de sol a montré que la matière organique a une polarité (N+O/C) similaire, peu importe son origine. Aucune différence significative entre les coefficients de partition ( $K_{mo}$ ) n'avait été notée.

### 1.3.2.2 Argile

Tel que discuté à la section 1.1.2.2, les surfaces minérales, généralement chargées, ont tendance à former des liaisons hydrogènes avec les molécules d'eau ou les ions adjacents. Or, les composés organiques non polaires ne peuvent former de liaisons hydrogène avec la surface du sol car leur adsorption n'implique que des forces de van der Waals (Pignatello et Xing, 1996) dont l'intensité augmente avec le poids moléculaire du contaminant (Kowalska *et al.*, 1992). Dans le cas de cycle benzénique (comme les HAP), il y a également induction de dipôles (Schwarzenbach *et al.*, 1993). La formation d'un lien hydrogène implique beaucoup plus d'énergie que les forces de van der Waals ou

l'induction d'un dipôle dans un cycle benzénique. Ceci explique la grande affinité entre l'argile et l'eau, affinité causant l'orientation des molécules d'eau à la surface du sol. L'adsorption d'un contaminant non polaire suppose donc non seulement l'échange du contaminant avec les molécules d'eau, mais aussi, la partition dans ce volume de molécules organisées (Schwarzenbach *et al.*, 1993).

Il semble donc que l'adsorption des contaminants non polaires à la surface de l'argile ne soit pas favorisée et ce, malgré leur faible solubilité (Chiou, 1989). Cependant, pour les sols contenant de très faibles quantités de matière organique ( $f_{mo} < 0.002$ ), les coefficients d'adsorption mesurés sont souvent plus élevés que ceux prédits à l'aide de la quantité de matière organique présente (Mader *et al.*, 1997; Schwarzenbach *et al.*, 1993). Ceci suggère qu'en de telles circonstances, la phase minérale contribue significativement à l'adsorption (Karimi-Loftabad *et al.*, 1996; Mader *et al.*, 1997; Schwarzenbach *et al.*, 1993). Murphy *et al.* (1992) ont d'ailleurs montré l'adsorption d'anthracène et de dibenzothiophène sur la kaolinite et l'hématite.

Peu d'études sur l'adsorption des contaminants ont été réalisées avec des sols sans matière organique. Certaines concluent que les contaminants se lient moins aux particules grossières qu'aux particules plus fines d'un même matériau, en raison des différences de surface spécifique (Backus, 1990; Schwarzenbach *et al.*, 1993). Quelques auteurs stipulent que la surface seule ne peut expliquer le phénomène (Huang *et al.*, 1996; Murphy *et al.*, 1992) et que le type de minéraux aurait une influence prépondérante (Mader *et al.*, 1997). Huang *et al.* (1996) ont d'ailleurs mesuré des coefficients de distribution différents du phénanthrène pour divers types de minéraux. Le mécanisme d'adsorption lui-même suscite des interrogations. Ainsi, certains supportent l'hypothèse selon laquelle les contaminants interagissent avec l'eau liée plutôt qu'avec la surface minérale (Schwarzenbach *et al.*, 1993; Farrel et Reinhard, 1994).

### 1.3.2.3 Porosité

La porosité des sols est un autre facteur pouvant favoriser l'adsorption des contaminants. En effet, les molécules adsorbées dans les petits pores sont assujetties à beaucoup plus de tensions que les molécules adsorbées sur une surface plane. Lorsque la taille des pores diminue jusqu'au diamètre du contaminant, le potentiel d'interaction peut augmenter jusqu'à 5 fois à cause des interactions en de multiples points de la molécule (Pignatello et Xing, 1996). Ceci se produit principalement dans les micropores ( $D < 20 \text{ \AA}$ ). Il a d'ailleurs été prouvé que les énergies d'adsorption augmentent avec une diminution de la taille des pores (Everett et Powl, 1976).

### 1.3.2.4 pH

L'influence du pH sur l'adsorption des HAP est explorée dans quelques publications. Fall (1995), lors d'une étude statistique sur les divers facteurs pouvant influencer l'adsorption du phénanthrène, a conclu que le pH n'était pas un facteur significatif. Mader *et al.* (1997) n'ont pas observé de changement dans les coefficients d'adsorption de 4 HAP (pyrène, fluoranthène, anthracène, naphthalène) mesurés à 3 différents pH sur deux minéraux ( $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$  et  $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ). Dans une étude réalisée avec le phénanthrène, Huang *et al.* (1996) ont également conclu que le pH n'influait pas son adsorption sur un oxyde d'aluminium ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ). Par ailleurs, avec d'autres types de sol ( $\text{SiO}_2$ , quartz, kaolinite), les valeurs du coefficient de distribution ont augmenté de 50 à 100 % lors d'une augmentation de pH de 2 à 3 unités. Il semble donc qu'avec certains types de minéraux, le pH ait une influence sur l'adsorption, probablement par un effet sur le signe et la densité des charges à la surface des minéraux. Ces charges auraient un impact sur l'induction de dipôles dans les molécules organiques non polaires (Mader *et al.*, 1997).

Le pH a également une influence sur l'adsorption des contaminants dans la matière organique. En effet, à faible pH, les charges répulsives entre les groupes hydroxyles et carboxyles sont neutralisées, ce qui entraîne un enroulement de la matière organique. Cette dernière s'attache moins à la surface minérale et sa configuration défavorise l'adsorption des contaminants (Murphy *et al.*, 1992).

#### **1.3.2.5 Force ionique**

La force ionique (I) de la solution peut influencer la solubilité d'un contaminant, d'où son adsorption (Fall, 1995). Ainsi, une augmentation de la force ionique se traduit par une augmentation de l'adsorption. Mader *et al.* (1997) ont démontré que pour certains HAP, une augmentation de la force ionique d'un facteur de 50 dans le cas d'adsorption sur du  $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$  et d'un facteur 10 dans le cas du  $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$  n'avait pas d'influence sur le coefficient de distribution ( $K_d$ ).

Une force ionique faible incite la matière organique à adopter une configuration plus ouverte ou linéaire lors de son adsorption sur les surfaces minérales, ce qui favorise l'adsorption des contaminants. Murphy *et al.* (1992) ont d'ailleurs rapporté que l'adsorption d'anthracène passe de 47 à 80 % lors d'une diminution de la force ionique (I) de 0,1 à 0,005.

#### **1.3.2.6 Température**

Schwarzenbach *et al.* (1993) expliquent l'influence de la température sur l'adsorption des contaminants par son effet sur leur solubilité. Lüers et ten Hulsher (1996), dans une étude effectuée sur 5 HAP de masse molaire élevée, ont observé qu'une diminution de température de 10°C entraînait une augmentation du coefficient de partition dans la matière organique ( $K_{mo}$ ) de 60 %.

### **1.3.2.7 Teneur en eau des sols**

Karimi-Loftabad *et al.* (1996) ont observé que les interactions des contaminants organiques non polaires avec l'argile du sol sont favorisées lorsque ce dernier possède une faible teneur en eau. En effet, les molécules d'eau sont fortement liées aux surfaces minérales du sol par des liaisons hydrogène. Lorsque le sol est sec, la surface devient disponible pour l'adsorption des contaminants non polaires. Karimi-Loftabad *et al.* (1996) ont contaminé un sol sec (0% d'humidité) par de l'anthracène. Après 30 minutes de contact avec le sol, 50 % du contaminant n'était plus extractible et ce pourcentage s'élevait à 100 % après 6 jours. Des résultats similaires ont été obtenus avec le phénanthrène (20 % n'était plus extractible après 4 jours) et le pyrène. L'adsorption sur la surface minérale peut donc être le processus dominant en présence de sols secs pour les composés organiques non polaires (Chiou, 1989).

## **1.3.3 Caractéristiques de la contamination**

Deux facteurs reliés à la contamination, soit l'âge et la présence d'un cosolvant, ont un effet sur l'adsorption des contaminants. Cette section détaille l'étendue de leur influence.

### **1.3.3.1 Âge de la contamination**

De nombreuses recherches concluent que l'adsorption et la désorption des composés organiques se produisent en deux temps: une phase initiale rapide et réversible, suivie par une période lente qui s'échelonne sur des semaines, des mois, voire des années (Farrel et Reinhard, 1994; Hatzinger et Alexander, 1995; Loehr et Webster, 1996; Pignatello et Xing, 1996; Ramaswami et Luthy, 1997). Ceci mène à une fraction de contaminant récalcitrante qui résiste à la désorption (Hatzinger et Alexander, 1995). La séparation entre les phases rapide et lente est arbitraire, mais dans plusieurs cas, elle a lieu quelques heures ou quelques jours après la contamination (Pignatello et Xing, 1996).

Des études montrent que le coefficient de distribution ( $K_d$ ) peut augmenter de 30 à 1000 % entre un temps de contact court et un temps de contact plus long (voir tableau 1.4). Le coefficient de distribution est donc clairement fonction du temps de contact entre le sol et le contaminant.

Cette augmentation de l'adsorption du contaminant est dénommée «aging» (vieillissement) ou «weathering». Selon Hatzinger et Alexander (1995), le vieillissement n'inclut pas les réactions qui altèrent la structure des molécules telles que la polymérisation et les liens covalents avec les substances humiques. Une lente diffusion du contaminant dans la matière organique sous l'effet d'un gradient de concentration peut expliquer le vieillissement des sols.

**Tableau 1.4: Exemples d'observations d'adsorption lente**

	Période de contact (jours)		$K_d(\text{long})/K_d(\text{court})$
	long	court	
PCE dans un aquifère sableux *	10	1	3
TeCB dans un aquifère sableux *	100	1	10
Pyrène dans des sédiments de lac	180	3	2
Phénanthrène dans des sédiments de lacs	180	3	2
Picloram dans divers sols	300	7	1.5-3.9
Lindane dans sable de surface	167	4.2	4
* PCE, tétrachloroéthène; TeCB, 1, 2, 4, - tétrachlorobenzène			
tiré de (PIGNATELLO et XING, 1996)			

L'autre hypothèse, largement acceptée par la communauté scientifique, veut que les contaminants diffusent lentement et deviennent emprisonnés dans les petits pores des agrégats de sol qui peuvent contenir de la matière organique. La diffusion dans les pores peut se faire dans le liquide ou encore à la surface des pores, mais ces deux modes peuvent intervenir en même temps et sont difficiles à distinguer (Pignatello et Xing,

1996). À long terme, la fraction de contaminants adsorbée augmente et résiste à la désorption.

### 1.3.3.2 Présence d'un cosolvant

En proportion suffisante (plus de 10 % volumique), la présence d'un cosolvant organique augmente la solubilité aqueuse d'un contaminant organique (Schwarzenbach *et al.*, 1993). L'adsorption des composés en présence d'un tel solvant est donc plus faible. Par exemple, pour le pyrène, le coefficient logarithmique de partition ( $\log K_{mo}$ ) passe de 4.21 à 3.21 lorsque le contenu en méthanol varie de 0 à 30 % (Kimble et Chin, 1994). De plus, la présence d'un cosolvant modifie les propriétés de la matière organique par un gonflement de la matrice polymérique qui augmente la vitesse de désorption des contaminants (Brusseau, 1991).

## 1.4 BIODISPONIBILITÉ

La biodisponibilité d'une substance se définit comme la fraction de la concentration totale d'un contaminant qui peut être assimilée par un organisme (van Straalen, 1996). Pour un organisme vivant dans le sol, les principales voies d'exposition sont l'ingestion de sol, le contact direct (dermique, membranaire) de l'organisme avec le sol ou la phase aqueuse, l'inhalation des composés volatilisés dans la phase gazeuse et enfin, l'ingestion indirecte par d'autres organismes de la chaîne trophique (ex: proie-prédateur) (Renoux, 1995). La quantité de contaminant dans chacune de ces phases influence donc fortement les voies d'exposition et les réponses pouvant être observées. En conséquence, les concentrations dans la matrice du sol fournissent peu d'informations sur leur degré de biodisponibilité qui est principalement influencé par les propriétés physiques et chimiques du sol et la nature du contaminant (Renoux, 1995).



L'ensemble des caractéristiques influençant les interactions des HAP avec le sol (voir section 1.3) sont susceptibles d'influencer la biodisponibilité. Cependant, quelques précautions doivent être prises. Ainsi, alors que certains auteurs prétendent que la toxicité d'un contaminant peut être prédite à l'aide de sa solubilité aqueuse (van Gestel *et al.*, 1991a), d'autres affirment que les contaminants liés peuvent éventuellement se comporter comme des toxiques en étant relargués lors de la décomposition de la matière organique ou encore par ingestion de particules contaminées (Landrum et Robbins, 1990).

La biodisponibilité des contaminants peut être mesurée à l'aide de tests de minéralisation ou encore de tests de toxicité avec des organismes comme le ver de terre (Kelsey *et al.*, 1997; Robinson *et al.*, 1990; White *et al.*, 1997). La biodisponibilité des HAP pour les bactéries constitue un aspect particulièrement important car elle influence leur biodégradation, d'où le succès des efforts de biorestauration (Middleton *et al.*, 1991). Il est admis que pour qu'un micro-organisme dégrade un contaminant organique, ce dernier doit être en phase aqueuse (Robinson *et al.*, 1990; Scribner *et al.*, 1992). Ceci implique que seule la fraction de contaminants dissoute dans l'eau est biodisponible pour les micro-organismes, la fraction adsorbée étant réfractaire à la biodégradation (Ramaswami et Luthy, 1997). La biodisponibilité des contaminants organiques pour les organismes des tests de toxicité sera discutée à la section suivante.

## 1.5 ECOTOXICOLOGIE

L'écotoxicologie se définit comme l'étude du sort et des effets de substances toxiques sur les écosystèmes (Burton, 1990) et fournit des données pour l'évaluation du risque et la gestion environnementale (Forbes et Forbes, 1994). Cette section, après avoir décrit certaines notions sur la mesure de l'écotoxicité, présente les différents tests d'écotoxicité réalisés sur les sols.

### 1.5.1 Mesure de la toxicité

Plusieurs types d'essais, allant de l'étude de terrain aux tests en laboratoire, peuvent être utilisés pour évaluer la toxicité d'un contaminant. Les études de terrain permettent de tenir compte des interactions dynamiques entre les espèces et des conditions environnementales du milieu, deux facteurs qui modifient les interactions entre les différentes composantes d'un écosystème (Joern et Hoagland, 1996). Cependant, ces études sont coûteuses et les résultats parfois difficiles à analyser (Huckabee, 1985). À l'opposé, les essais standardisés en laboratoire génèrent des résultats uniquement applicables aux conditions physico-chimiques dans lesquelles ils ont été obtenus, mais sont moins coûteux, répliquables, et donnent une bonne idée de la toxicité potentielle associée à une contamination.

Chaque test de toxicité standardisé détecte spécifiquement un type de toxicité correspondant à une période d'exposition donnée (Klassen *et al.*, 1986). Les tests de toxicité aiguë réfèrent à des expositions de courte durée qui se traduisent par des effets rapides et importants, tels que la létalité. Ces tests sont habituellement faciles à réaliser et économiques (Renoux, 1995). D'autres tests, dits chroniques, réfèrent à des expositions prolongées se traduisant par des effets moins rapides ou différés dans le temps (effets sublétaux, à court ou long terme) (Bureau, 1998).

Les tests de toxicité permettent d'établir une relation concentration-réponse, où l'effet toxique s'exprime en fonction de la concentration de contaminant (Renoux, 1995). Habituellement, l'importance de l'effet est déterminée par la  $CE_{50}$ , c'est-à-dire la concentration où l'effet se manifeste chez 50 % des organismes exposés. Dans le cas de létalité ou d'inhibition, on parle plutôt de  $CL_{50}$  ou  $CI_{50}$ .

L'utilisation de tests standardisés pour estimer le potentiel toxique a pourtant ses limites car de nombreux facteurs peuvent influencer la manifestation de la toxicité et la

reproductibilité des réponses (souche des organismes, propriétés du sol, conditions de mise en œuvre). De plus, pour un composé donné, la susceptibilité entre les espèces est très variable (Truhaut, 1977). Pour bien connaître l'étendue de l'influence d'un contaminant, il est donc important d'utiliser des tests de niveau trophique différent.

Lors du choix d'un test de toxicité, la représentativité vis-à-vis de la matrice étudiée est un facteur important à considérer (Keddy *et al.*, 1994). Ainsi, pour évaluer la toxicité d'un sol, deux voies d'exposition doivent être considérées: par contact direct via les organismes vivants dans le sol ou encore par contact indirect via les eaux de ruissellement (Santini, 1998). Bien que l'exposition par contact direct soit la plus adaptée à la mesure du potentiel toxique des sols (Keddy *et al.*, 1994), fort peu d'essais de ce type ont été développés comparativement à ceux pour les systèmes aquatiques (Sheppard *et al.*, 1992). À l'exception d'un test sur un organisme de l'ordre des collemboles, l'ensemble des tests de toxicité standardisés concernent la germination et la croissance de différentes espèces de plantes et des tests sur des vers de terre.

### **1.5.2 Tests avec ver de terre**

Le ver de terre est un organisme essentiel de la biomasse animale des horizons supérieurs de la pédosphère. À la base de la chaîne alimentaire, il constitue la nourriture principale et secondaire de plus de 200 organismes vivants (Bouché, 1992). En plus de contribuer au processus complexe de dégradation des débris de plantes et à la minéralisation des composés organiques, il mélange le sol, aide au maintien de sa structure et améliore l'aération et le transport de l'eau (Becker, 1992). Il a également tendance à concentrer certains pesticides et métaux lourds dans ses tissus (Reinecke, 1992). Étant donné son rôle important dans la vitalité du sol et la chaîne alimentaire, le ver de terre représente donc un organisme de choix pour effectuer un test de toxicité.

Cette section traite des divers tests de toxicité effectués sur les vers de terre, de leurs conditions de survie, de l'ingestion des contaminants, et enfin des facteurs influençant la biodisponibilité et la réponse toxique. La dernière partie résume les données écotoxicologiques disponibles dans la littérature sur la toxicité des HAP sur cet organisme.

### **1.5.2.1 Types de test**

Plusieurs types de tests peuvent être effectués: des tests de toxicité aiguë ayant la mortalité du ver de terre comme paramètre d'évaluation, des études sur les effets chroniques et enfin, des études de bioaccumulation.

Les tests de toxicité aiguë sont largement utilisés et d'importantes banques de données sont ainsi disponibles (Callahan *et al.*, 1994; Neuhauser *et al.*, 1985; Roberts et Dorrough, 1984). Deux tests standards ont été développés par l'Organisation pour la Coopération et le Développement Économiques (OCDE) pour évaluer la toxicité d'un contaminant. Dans le premier, les vers sont mis en contact avec le contaminant sur un papier filtre pour évaluer la toxicité d'une solution aqueuse. L'autre test implique la mise en contact des vers avec un sol standard artificiellement contaminé. Ce test permet de tenir compte des interactions entre le sol et le contaminant, et d'avoir une idée plus juste de la toxicité qui lui est associée.

Les tests de toxicité chronique renseignent sur le devenir d'une communauté de vers de terre. L'évaluation de la reproduction se déroule sur une période de temps assez longue pour permettre la production de cocons qui sont ensuite dénombrés. La perte de poids des vers est un paramètre sous létal pouvant être mesuré lors de la réalisation d'un test de mortalité et la formation d'adduits à l'ADN représente un paramètre d'évaluation prometteur pour les composés génotoxiques (Nadeau, 1997). D'autres variables de

réponse comme le comportement, les effets physiologiques et morphologiques peuvent également être utilisées (Kokta, 1992).

La mesure de la bioaccumulation des contaminants chez les vers de terre est effectuée à l'aide de composés radio-marqués ou d'extractions chimiques (Ma *et al.*, 1995; White *et al.*, 1997). Cet essai permet de mesurer la biodisponibilité d'un contaminant mais ne constitue pas un test de toxicité.

Plusieurs espèces de vers de terre sont utilisées pour réaliser les tests de toxicité (*Lumbricus terrestris*, *Eisenia foetida*...). *Eisenia foetida*, un ver de compost, est très utilisé car sa culture en laboratoire est plus facile que celle des autres types de vers (Edwards, 1992). Comme le test de l'OCDE recommande son utilisation, il existe une banque de données non négligeable sur la toxicité des contaminants pour ce ver (Neuhauser *et al.*, 1985; Roberts et Dorough, 1984). Cependant, *Eisenia foetida* est moins sensible aux contaminants que les autres espèces. Edwards et Coulson (1992) rapportent qu'un facteur de 10 pourrait représenter la toxicité pour les vers de terre les plus sensibles.

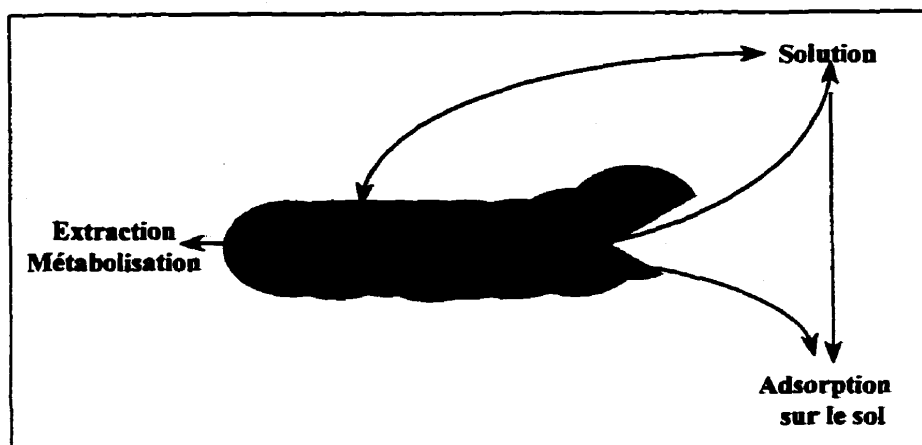
#### **1.5.2.2 Conditions environnementales pour la survie du ver**

La survie du ver de terre nécessite le respect de plusieurs conditions environnementales et ces dernières doivent être considérées lors de la réalisation de tests de toxicité. Ainsi, le sol doit contenir une quantité suffisante de matière organique pour assurer l'alimentation du ver. Une quantité d'argile trop importante peut également causer des phénomènes d'évitement, surtout si cette dernière est trop compacte (Bastien, 1997). De plus, les vers ne vivent pas dans les sols très sablonneux à cause de leur faible capacité de rétention en eau.

La survie des organismes requiert généralement un pH de sol compris entre 4 et 10. L'OCDE conseille de l'ajuster à  $6,0 \pm 0,5$  lors de la réalisation des tests. La température optimale pour l'activité des vers de terre diffère selon les espèces. Ainsi, l'activité optimale d'*E. foetida* se situe entre 16 et 23°C et celle de *L. terrestris* à 10°C. Les températures élevées limitent plus l'activité des vers que les températures basses (Edwards, 1992). Enfin, leur métabolisme est favorisé lorsque la teneur en eau des sols est élevée (Presley *et al.*, 1996).

### 1.5.2.3 Ingestion de contaminants

Le ver de terre se nourrit de différents types de matière organique et des organismes qu'elle contient (rotifères, champignons, bactéries) (Roberts et Dorough, 1985). Le sol est ingéré et le système digestif extrait les nutriments de l'importante quantité de sol qui passe au travers de son tractus digestif (Stenersen, 1992). La figure 1.6 présente les mécanismes d'entrée d'un contaminant dans le ver de terre. Ainsi, le contaminant peut être absorbé par les tissus après dissolution dans l'eau ou encore, absorbé par les intestins lors de l'ingestion de sol (Stenersen, 1992). Cependant, l'effet toxique n'est pas uniquement tributaire de la quantité de contaminant assimilée, car le ver a la capacité d'excréter et de métaboliser les xénobiotiques. La réponse toxique dépend donc de la balance entre le taux de préhension et d'excrétion/métabolisation du contaminant (Edwards et Coulson, 1992; Stenersen, 1992).



**Figure 1.6: Mécanismes de préhension et d'excrétion des contaminants par le ver de terre**

Comparativement aux mammifères, aux poissons et aux insectes, il existe peu d'informations sur les systèmes responsables de la biotransformation des xénobiotiques dans les vers de terre, car aucune étude toxicocinétique complète n'a été publiée. Certaines enzymes de transformation ont cependant été étudiées et il semblerait qu'un cytochrome (cyt.-PY450IA) jouerait un rôle important dans l'oxydation des xénobiotiques avec une structure moléculaire plate, tels que les hydrocarbures polyaromatiques (Stenersen, 1992).

#### **1.5.2.4 Biodisponibilité des contaminants pour le ver de terre**

Il a été démontré avec évidence que la biodisponibilité d'un contaminant a un effet déterminant sur la sévérité des effets sur le ver de terre (Becker, 1992). Selon plusieurs auteurs, le contenu en matière organique a un effet primordial sur la biodisponibilité des contaminants organiques (Alexander, 1995; Lofs-Holmin, 1980; van Gestel et Ma, 1990). Van Gestel (1992) a montré que pour les composés phénoliques, les valeurs de  $CL_{50}$  peuvent être extrapolées sur la base des différences du sol en matière organique. Cependant, une expérience de bioaccumulation avec du phénanthrène a montré que bien que cette dernière était élevée dans un sol contenant 1.1 % de matière organique, elle était

similaire dans des sols contenant 4.5, 8.5 et 13.0 % de matière organique (White *et al.*, 1997).

Lofs-Holmin (1980) a également montré, à l'aide d'une étude réalisée sur un fongicide (le bénomyl), que le contenu en argile pouvait avoir une influence sur la toxicité d'un contaminant. Lors de cette étude, aucun effet n'a été observé sur la croissance et la mortalité du ver de terre dans un sol contenant des proportions égales d'argile et de fumier tandis que la croissance était retardée et le taux de mortalité augmenté lorsque l'argile était remplacé par du sable. Par ailleurs, l'expérience de White *et al.* (1997) décrite au paragraphe précédent n'a pu montrer de relation entre le contenu en argile et la bioaccumulation du phénanthrène. En effet, la bioaccumulation semblait plus élevée dans les sols riches en argile.

Les études résumées ci-dessus montrent qu'une relation entre le type de sol et la toxicité d'un contaminant n'est pas clairement démontrée, mais aucune étude systématique n'a été réalisée pour établir un tel lien (Alexander, 1995; van Gestel, 1992).

L'âge de la contamination constitue un autre facteur pouvant influencer significativement la biodisponibilité des contaminants. Quelques études ont ainsi montré que la bioaccumulation du phénanthrène diminuait en fonction du temps dans des sols stérilisés (Kelsey *et al.*, 1997; White *et al.*, 1997).

#### **1.5.2.5 Toxicité des HAP pour le ver de terre**

Malgré l'abondance de données toxicologiques sur les organismes aquatiques, peu de données sont disponibles sur la toxicité des HAP sur les organismes terrestres. Neuhauser *et al.* (1985), dans une étude exhaustive sur 7 classes de contaminants (phénols, amines, aromatiques substitués, aliphatiques halogénés, HAP et phtalates) ont



observé que les contaminants ayant la plus faible toxicité étaient ceux ayant une faible solubilité. Cette étude montrait également des différences importantes au sein de la classe des HAP. Ainsi, lors d'un test de contact de 2 jours, la  $CL_{50}$  de l'acénaphthène était de  $49 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ , celle du fluorène 171 de  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  et celle du fluoranthène de  $2160 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ . Par rapport à d'autres types de contaminants, cette étude classait l'acénaphthène comme étant très toxique, le fluorène modérément et le fluoranthène relativement peu toxique.

### **1.5.3 Tests avec plantes**

Grâce à leur capacité photosynthétique d'absorber le dioxyde de carbone pour le transformer en oxygène, les plantes sont à la base de la chaîne alimentaire et constituent ainsi un composant primordial des écosystèmes terrestres. Les plantes sont particulièrement sensibles aux contaminants présents dans le sol car les racines sont en contact direct avec ce dernier et elles y puisent directement leur eau et leurs éléments nutritifs (Renoux, 1995).

Cette section présente les tests effectués avec les plantes, les conditions environnementales influençant leur développement et la biodisponibilité des contaminants. La dernière section traite des données toxicologiques disponibles dans la littérature.

#### **1.5.3.1 Types de tests**

Plusieurs paramètres d'évaluation sont utilisés pour déterminer l'effet de contaminants sur les plantes; les plus communs sont la croissance de la plante et des racines, de même que la germination. D'un point de vue pratique, ces tests sont peu coûteux et relativement rapides (5 à 15 jours).

Les semences de plantes, dans un état de dormance, peuvent survivre dans un rude environnement sans pour autant perdre leur viabilité (Wang, 1991). Cependant, lorsqu'elles sont hydratées et mises dans des conditions favorables, les graines subissent des changements rapides. Leur métabolisme, le transport des nutriments et la division cellulaire sont activés (Mayer et Poljakoff-Mayber, 1989), et la plante devient très sensible aux stress environnementaux. Ceci fait de la germination un paramètre de mesure fort approprié.

La mesure de la croissance des pousses et des racines s'effectue en mesurant la longueur de chaque pousse ou racine, ou encore en prenant le poids total de la biomasse (sèche ou humide). Quelques études rapportent que la croissance des racines est un paramètre d'évaluation plus sensible que la croissance des pousses (Wang, 1991).

De nombreuses espèces de plantes, sont utilisées pour la réalisation des tests de toxicité. Le tableau 1.5 résume celles recommandées par l'EPA, la Food and Drug Administration (FDA) et l'OCDE.

**Tableau 1.5: Types de plantes recommandées pour la réalisation des tests de toxicité**

<b>EPA</b>	<b>FDA</b>	<b>OCDE</b>
choux	choux	choux
carotte	carotte	cresson
oignon	blé	fenugrec
maïs	fève	moutarde
concombre	concombre	radis
laitue	laitue	laitue
avoine	avoine	avoine
seigle	seigle	seigle
soya	soya	navet
tomate	tomate	colza
blé		blé
		vesce
		riz
		radis

tiré de Wang (1991).

Les plantes présentées au tableau 1.5 proviennent de différentes familles. Par exemple, l'avoine, le blé et le maïs font partie de la famille des *Poaceae* alors que la laitue appartient à la famille des *Asteraceae*. Or, au sein d'une même famille les plantes présentent souvent une sensibilité très différente pour un même contaminant (Fletcher, 1991). Pour avoir une idée exacte de la toxicité, les organismes gouvernementaux (EPA, FDA, OCDE) recommande l'utilisation d'au moins deux familles de plantes et de plusieurs espèces au sein d'une même famille (Fletcher, 1991).

### **1.5.3.2 Conditions environnementales pour le développement des plantes**

Les propriétés physiques et chimiques du sol déterminent l'environnement de la graine et ses conditions de croissance. Ainsi, les propriétés physiques contrôlent la capacité de rétention en eau et l'aération du sol, deux facteurs contrôlant la quantité d'eau et d'oxygène qui atteint la graine (Mayer et Poljakoff-Mayber, 1989).

La force ionique de l'eau est également un paramètre pouvant affecter la germination par des effets osmotiques. Enfin, le développement des plantes est aussi influencé par la luminosité et la température. (Mahalakshmi, 1995; Mayer et Poljakoff-Mayber, 1989).

Lors de la réalisation d'essais de toxicité l'ensemble des paramètres décrits ci-dessus doivent être ajustés en fonction de la plante choisie pour éviter que la toxicité observée ne soit tributaire d'un de ces paramètres externes.

### **1.5.3.3 Biodisponibilité des contaminants pour les plantes**

La quantité de contaminant en solution est le principal facteur contrôlant leur biodisponibilité pour les plantes (Günther et Pestemer, 1990). Tous les facteurs influençant la quantité de contaminants dans la phase aqueuse des sols sont donc susceptibles d'affecter cette biodisponibilité (voir section 1.3).

### **1.5.3.4 Toxicité des contaminants organiques pour les plantes**

Bien que de nombreuses études aient été réalisées sur la toxicité des métaux pour les plantes, celles sur les composés organiques autres que les herbicides sont plus rares. Certaines ont cependant démontré que les cyanures, les azides, les hydroxylamines et les composés phénoliques inhibent la germination et la croissance des racines (Hiley, 1994; Wang, 1991). Aucune donnée toxicologique n'est disponible pour les HAP à l'état pur. Cependant, Hund et Traunspurger (1994) ont montré qu'un sol contaminé par 4500 mg/kg de sol sec d'un mélange complexe de HAP diminue la croissance de *Brassica rapa* et *Avena sativa* de façon significative. Santini (1998) a également montré qu'un sol contaminé par 531 mg/kg de sol sec d'un mélange de HAP induit une diminution de la croissance et de la germination du cresson (*Lepidium sativum*).

## 1.6 CONCLUSION

La revue de littérature a présenté les différents facteurs qui influencent la biodisponibilité et la toxicité de contaminants organiques non polaires tels que les HAP. Les contaminants adsorbés étant moins biodisponibles que ceux dans la phase aqueuse, ces facteurs sont principalement reliés à leur distribution entre les diverses phases du sol.

Dans le cas de composés organiques, il semble que les principaux facteurs affectant la biodisponibilité soient le contenu en matière organique et en argile. Cependant, la plupart des études concernent les pesticides, les herbicides, les phénols ou les métaux. Hormis une étude de bioaccumulation peu concluante (White *et al.*, 1997), aucune étude exhaustive sur l'influence de la composition du sol sur la toxicité d'un contaminant non polaire n'a été effectuée.

Les principaux organismes utilisés dans les tests de toxicité appliqués au sol sont le ver de terre et différentes espèces de plantes. Peu de données sont toutefois disponibles sur la toxicité des HAP purs ou présents individuellement dans un sol sur ces deux types d'organismes. Dans le cas du ver de terre, il semble que les HAP plus mobiles (fluorène, acénaphthène) soient plus toxiques que le fluoranthène, un HAP de masse molaire élevée. Les mélanges complexes de HAP ont également un effet sur la germination et la croissance de quelques espèces de plantes (*Avena sativa*, *Brassica rapa*, *Lepidium sativum*).

## **CHAPITRE II**

### **OBJECTIFS ET MÉTHODOLOGIE GÉNÉRALE DU PROJET**

*La revue de littérature a mis en évidence les nombreux facteurs qui peuvent influencer la réponse toxique d'un contaminant organique. Parmi ceux-ci, le contenu en matière organique et en argile constitue deux facteurs très importants. Après les objectifs généraux, ce chapitre présente les éléments à considérer pour le développement du plan méthodologique, lui-même présenté à la dernière section.*

*Pour une meilleure compréhension, quelques termes doivent préalablement être définis. Ainsi, les expressions «type de sol» ou «composition des sols» réfèrent à la proportion de limon, de sable, d'argile et de matière organique, eux-mêmes dénommés «composants». La «nature des composants» fait référence à leurs provenance et propriétés.*

## 2.1 HYPOTHÈSES DE RECHERCHE ET OBJECTIFS

La revue de littérature a mis en évidence que le contenu en matière organique et en argile influence la biodisponibilité et donc la toxicité des contaminants organiques. Cependant, peu d'études concluantes ont été effectuées sur des composés organiques non polaires. Une étude exhaustive sur différents sols permettrait donc d'établir un lien entre la composition du sol et la toxicité de ce type de contaminant, et possiblement de modéliser cette toxicité en fonction de la composition du sol. Cependant, il faut au préalable vérifier l'hypothèse selon laquelle **l'influence de l'argile et de la matière organique sur la toxicité d'un contaminant organique non polaire est assez marquée pour permettre l'élaboration d'un modèle prédictif.**

Ce projet vise donc à développer une méthodologie permettant l'élaboration d'un modèle prédictif de la toxicité d'un contaminant non polaire en fonction du contenu en matière organique et en argile du sol. Ce modèle sera réalisé par l'évaluation écotoxicologique de plusieurs sols contenant diverses fractions de matière organique, de sable et d'argile, et contaminés par une concentration unique d'un HAP, la classe de contaminants non polaires prise comme modèle.

Les objectifs spécifiques de ce projet de maîtrise sont les suivants:

- Trouver une approche statistique permettant d'élaborer un modèle prédictif.
- Sélectionner des compositions représentatives de sols pouvant être contaminés et susceptibles d'engendrer des différences de toxicité marquées.
- Choisir la nature des composants des sols.
- Préparer et caractériser les sols au niveau physique, chimique et toxicologique.

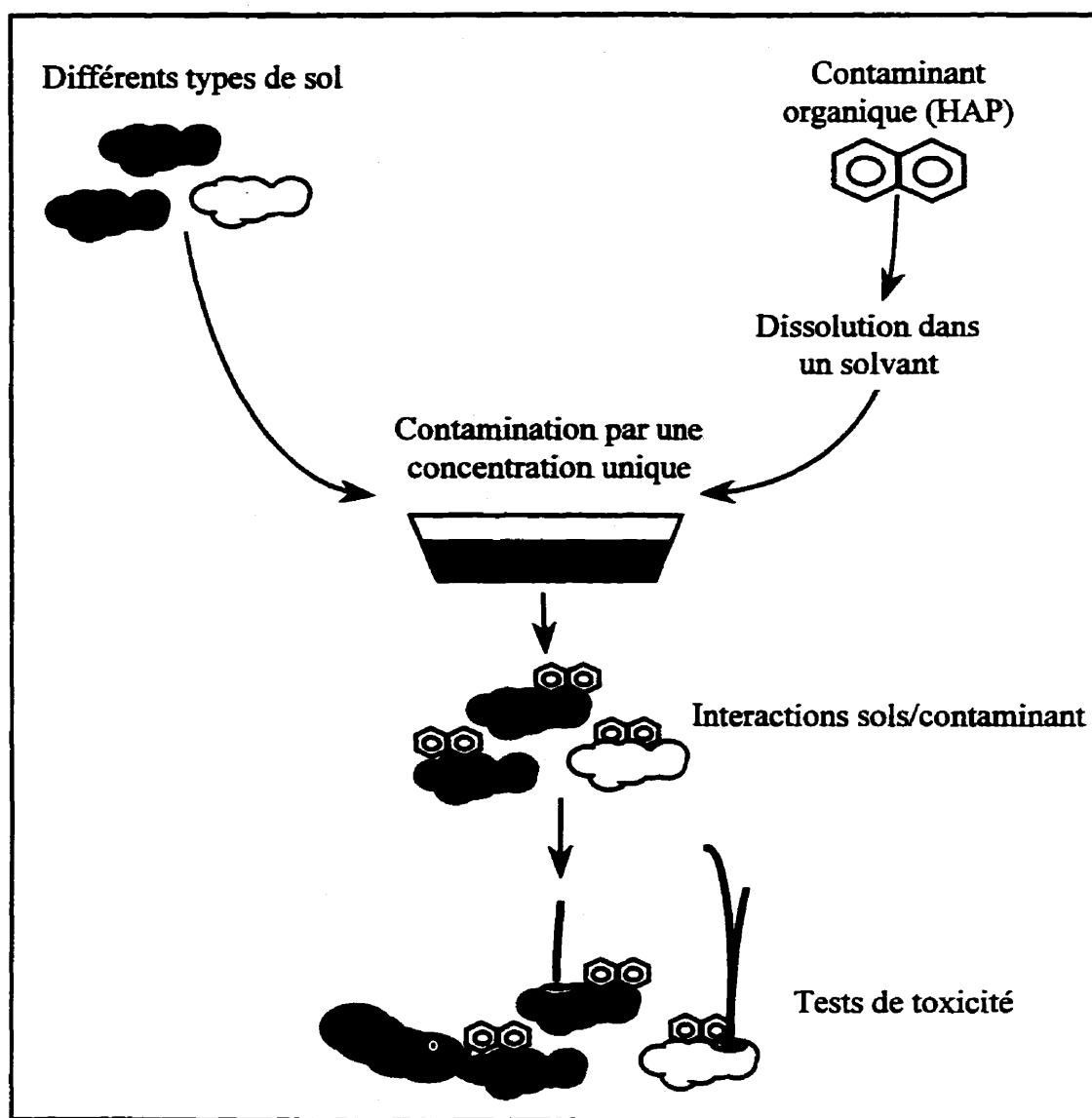
- Mettre au point une méthode de préparation des sols contaminés.
- Sélectionner des tests de toxicité directement appliqués aux sols.
- Sélectionner un HAP auquel les organismes des tests de toxicité sont sensibles et qui engendre des réponses reproductibles.
- Valider la méthodologie développée.

Les facteurs à l'étude sont **uniquement** le contenu en argile et en matière organique du sol. Or, la revue de littérature a montré que plusieurs autres facteurs peuvent également influencer la réponse toxique d'un sol contaminé. La méthodologie doit donc être développée de façon à minimiser l'impact des facteurs externes sur les réponses toxiques dans les divers types de sol. Cette considération doit être prise en compte dans chacun des objectifs spécifiques énumérés ci-dessus.

## 2.2 MÉTHODOLOGIE GÉNÉRALE

Les manipulations à effectuer pour obtenir les réponses toxiques permettant l'élaboration d'un modèle prédictif sont présentées à la figure 2.1. Des sols contenant diverses proportions de sable, d'argile et de matière organique seront contaminés par **une concentration unique** de contaminant dissous dans un solvant. Les sols seront ensuite artificiellement vieilliss pour favoriser la formation d'interactions avec le contaminant avant d'être soumis à des tests de toxicité.





**Figure 2.1: Méthodologie pour l'élaboration d'un modèle prédictif**

L'élaboration d'un modèle prédictif nécessite la réalisation de nombreuses étapes préalables. Les sols et le contaminant doivent être choisis, et plusieurs facteurs doivent être considérés pour que les réponses toxiques observées soient uniquement tributaires de l'effet du contenu en argile et en matière organique sur la biodisponibilité du contaminant. Cette section présente d'abord l'ensemble de ces facteurs, suivi du plan méthodologique du projet.

## 2.2.1 Facteurs influençant la réponse toxique

La figure 2.2 présente, résumés en 5 classes, les principaux facteurs influençant la réponse toxique d'un contaminant organique non polaire dans un sol. Les 3 premières concernent les facteurs qui affectent la biodisponibilité des contaminants, soit les propriétés du sol et du contaminant, l'âge de la contamination ainsi que les conditions en solution. Les deux autres classes incluent des facteurs liés à la contamination et au type d'organisme utilisé pour la réalisation des tests de toxicité. Cette section présente brièvement les actions prises pour mesurer l'étendue de leur influence et si nécessaire, pour la minimiser. De plus amples détails seront fournis dans les chapitres subséquents.

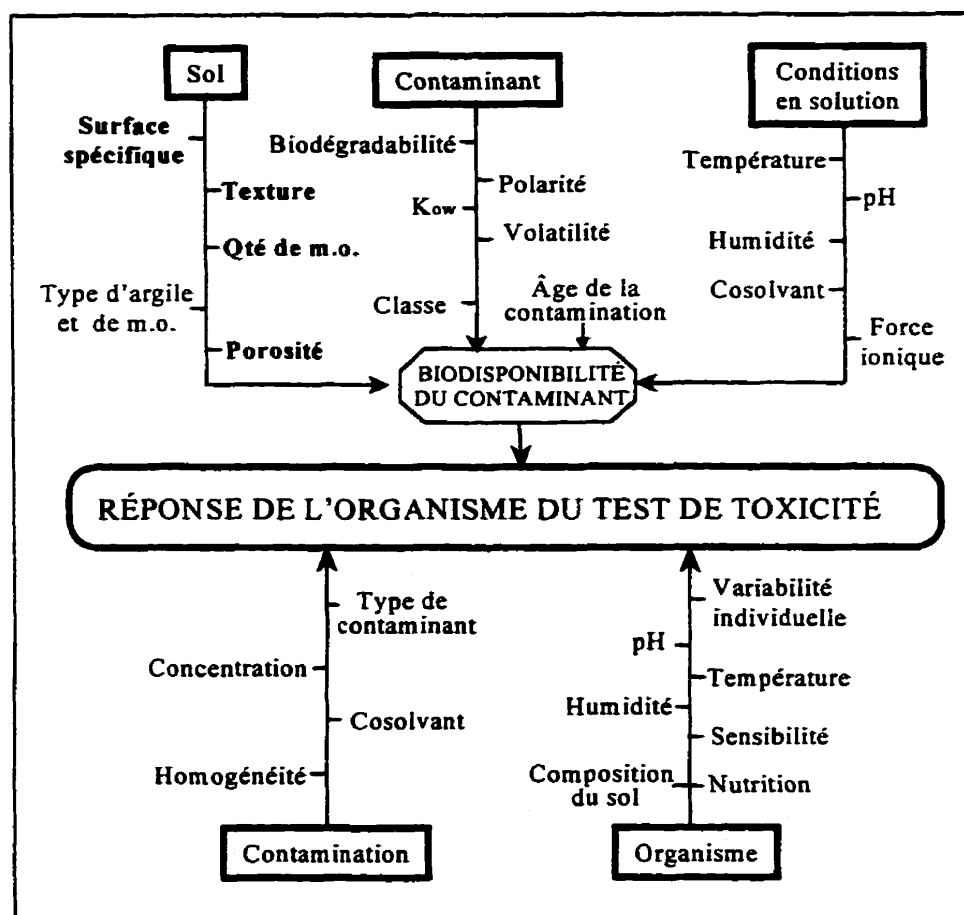


Figure 2.2: Principaux facteurs influençant la toxicité d'un contaminant dans un sol

### **2.2.1.1 Propriétés des sols**

Le contenu en argile et en matière organique du sol sont les facteurs à l'étude du projet. De ces composants dépendent certaines caractéristiques (porosité, surface spécifique) qui seront mesurées pour expliquer les différences de toxicité entre chaque sol.

Tel que mentionné à la section 1.3.2, la nature de la matière organique et de l'argile peut influencer l'adsorption des contaminants. Ce facteur sera donc contrôlé par l'utilisation de sols artificiels, dans laquelle la nature de chaque composant sera identique. Seule leur proportion variera dans chacun des sols.

### **2.2.1.2 Contaminant**

La classe des HAP a été choisie car ce sont des composés non polaires et hydrophobes ( $K_{ow}$  élevé) qui présentent une problématique industrielle. Afin de minimiser les pertes de contaminant, le HAP sélectionné doit être peu volatil et non biodégradable sur la durée de l'expérimentation. Les différences dans la texture et le contenu organique des sols entraînent en effet des propriétés physiques et biologiques dissemblables. La volatilité et la biodégradabilité pourraient donc se manifester différemment dans chacun des sols et introduire un biais important dans les réponses toxiques observées. Afin de vérifier la biodégradabilité et la volatilité du HAP sélectionné, des tests de minéralisation et des analyses chimiques devront être réalisés sur les sols contaminés.

Les organismes des tests de toxicité doivent également être sensibles au contaminant choisi et les réponses observées reproductibles.

### 2.2.1.3 Conditions en solution

Tel que discuté à la section 1.3.2, le pH, la force ionique, la température, la présence d'un cosolvant et la teneur en eau peuvent avoir une influence sur l'adsorption des contaminants. Afin de tenir compte des caractéristiques naturelles du sol, le pH et la force ionique ne seront pas uniformisés dans les différents sols. Les variations observées ne seront que le reflet des caractéristiques intrinsèques de chaque composant. Les mesures suivantes seront prises pour les autres facteurs:

- Pour limiter l'effet de la température sur l'adsorption des contaminants, l'ensemble de l'expérimentation (contamination, période de contact entre le sol et le contaminant, tests de toxicité) sera effectué à température constante, déterminée par les spécifications des tests de toxicité.
- Afin de limiter l'effet du solvant sur la solubilité des contaminants et la structure de la matière organique, une période de volatilisation sous la hotte après la contamination permettra d'en réduire la quantité résiduelle dans le sol.
- La teneur en eau sera ajustée en fonction des spécifications des tests de toxicité, c'est-à-dire un pourcentage fixe de la capacité de rétention en eau du sol. En raison des propriétés physiques spécifiques de chaque sol qui modifient cette capacité de rétention, il en résulte que la teneur en eau sera différente dans chacun des sols. Ceci ne devrait pas affecter l'adsorption sur les surfaces minérales, car cette dernière se manifeste à des teneurs en eau très faibles, inférieures à 1 % (Karimi-Loftabad *et al.*, 1996).

#### 2.2.1.4 Contamination

La concentration du contaminant, l'âge de la contamination, son homogénéité dans le sol et la présence d'un solvant sont tous des facteurs susceptibles d'influencer la réponse toxique des organismes soumis aux essais de toxicité. Les mesures prises pour chacun sont présentées ci-dessous.

- Lors des essais visant l'élaboration du modèle prédictif, les sols seront contaminés **uniquement** par la concentration correspondant à la  $CE_{50}$  du contaminant choisi pour les tests de toxicité retenus. Cette concentration effective sera déterminée au cours d'essais préliminaires réalisés uniquement sur le sol possédant les quantités médianes de matière organique et d'argile, un sol qui devrait engendrer une biodisponibilité également médiane. La contamination de l'ensemble des sols par cette concentration permettra de favoriser l'observation de différences entre les réponses toxiques des organismes exposés aux différents sols. Tel qu'expliqué à la section 2.2.1.2, le contaminant choisi doit être peu volatil et peu biodégradable sur la durée de l'expérimentation afin de garder sa concentration constante.
- La contamination des sols doit être homogène pour que les organismes des tests de toxicité soient exposés à la même concentration de contaminant. Un soin particulier sera donc apporté à cet aspect lors de la contamination des sols et l'homogénéité sera vérifiée à l'aide d'analyses chimiques réalisées sur plusieurs échantillons d'un même sol contaminé.
- Afin de limiter les effets toxiques du solvant sur les organismes soumis aux tests de toxicité, une période de volatilisation sera réalisée après la contamination des sols. Ces effets seront d'ailleurs mesurés lors d'essais préliminaires réalisés sur des sols contenant uniquement de l'acétone.

- Afin de s'assurer que l'âge de la contamination n'induit pas de biais dans les réponses toxiques observées, le temps de contact entre le sol et le contaminant sera identique dans chaque type de sol. Ce temps de contact sera déterminé par le temps entre la fin de la contamination et le début des essais de toxicité. À cause de contraintes temporelles, l'âge de la contamination (quelques jours) ne sera pas représentatif de l'âge des contaminations réelles qui peut atteindre des dizaines d'années. Cependant, les résultats obtenus permettront de connaître l'étendue de l'effet de la matière organique et de l'argile à court terme, un effet qui devrait s'intensifier dans le temps (voir section 1.3.3.1).

### 2.2.1.5 Organisme

La revue de littérature a présenté les organismes utilisés pour la réalisation de tests de toxicité en contact direct avec le sol, soit les vers de terre et diverses espèces de plantes. Pour connaître l'influence de la composition du sol sur deux niveaux trophiques différents, l'utilisation de deux tests de toxicité sera étudiée pour l'élaboration d'un modèle de prédiction: le test de germination et croissance de l'orge *Hordeum vulgare*, choisi pour son accessibilité d'où la réduction des coûts, et le test mortalité du ver *Eisenia foetida*, choisi pour sa rapidité d'exécution et l'existence de nombreuses données dans la littérature sur ce ver. Le nombre de tests choisis est limité par des considérations financières et logistiques.

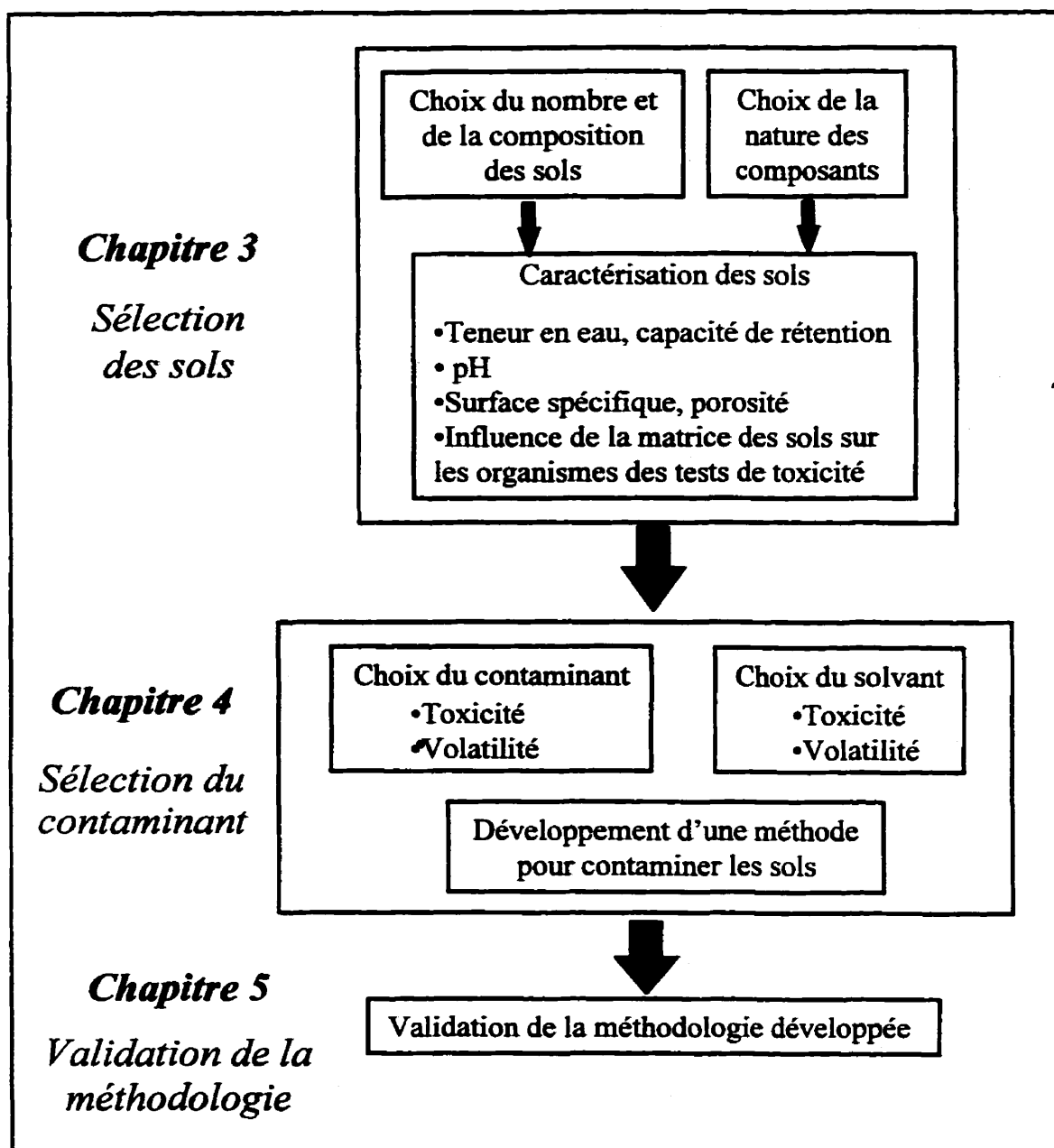
Outre la variabilité individuelle de chaque organisme qui sera vérifiée à l'aide de toxiques de référence lors de l'élaboration du modèle prédictif, certaines conditions environnementales peuvent affecter directement les organismes et par conséquent, leur réponse toxique. Les mesures prises pour limiter l'influence de ces facteurs sont décrites à la page suivante.

- Le pH, la température et la teneur en eau seront ajustés en fonction des spécifications des tests de toxicité.
- Afin de vérifier si la composition du sol et la quantité de nourriture (matière organique) affectent les organismes, des essais préliminaires seront effectués sur les sols non contaminés. Si un effet est noté, la composition des sols sera modifiée de façon à limiter son impact. De plus, lors de l'élaboration d'un modèle prédictif, les réponses toxiques obtenues pour les différents types de sol seront comparées à celles obtenues dans des sols non contaminés de composition identique.

### **2.2.2 Plan méthodologique du projet**

Le plan méthodologique utilisé pour la réalisation du projet est présenté à la figure 2.3. Il se divise en trois étapes temporellement dépendantes, chacune constituant un chapitre du mémoire. La première vise à choisir le nombre et la composition des sols, de même que la nature des composants. Une caractérisation chimique et toxicologique des sols permettra l'ajustement des conditions de réalisation des tests de toxicité (ex: teneur en eau, pH) et, si nécessaire, de la composition. L'évaluation de la surface spécifique et de la porosité permettra également de mieux connaître les propriétés adsorbantes des sols.

À partir d'essais préliminaires de toxicité et de volatilité réalisés sur une présélection de quelques HAP répondant aux critères énoncés à la section 2.2.1.4, le contaminant le plus approprié pour l'élaboration du modèle prédictif sera choisi. En plus de mettre au point une méthode de contamination des sols, cette étape permettra de déterminer la  $CE_{50}$  du contaminant choisi pour chaque test de toxicité, concentration par laquelle les différents types de sol seront ensuite contaminés lors de l'élaboration d'un modèle prédictif. De plus, des expériences seront réalisées pour déterminer la toxicité et les concentrations résiduelles de solvant.



**Figure 2.3: Plan méthodologique du projet**

La dernière étape consiste à valider la méthodologie développée, c'est-à-dire vérifier si des différences de toxicité sont observées pour quelques types de sol contaminés par une même concentration du contaminant choisi.



## **CHAPITRE III**

### **SÉLECTION DES SOLS**

*Le choix des types de sols revêt une importance primordiale pour le projet. En effet, de leur composition et caractéristiques dépendent les interactions des contaminants avec le sol. Les compositions choisies doivent engendrer des réponses toxiques distinctes qui permettront l'élaboration d'un modèle prédictif.*

*La première partie de ce chapitre présente les démarches effectuées pour déterminer le nombre et la composition des sols à l'aide d'un algorithme conçu pour les modèles statistiques appliqués aux mélanges. Viennent ensuite le choix de la nature des composants, et enfin, une description de la méthodologie pour préparer et caractériser les sols au niveau physico-chimique et toxicologique. La composition des sols choisis et leur caractéristiques sont présentées dans la deuxième partie du chapitre.*

### **3.1 MATÉRIEL ET MÉTHODES**

Cette section décrit les démarches et expériences effectuées pour choisir le nombre et la composition des sols, déterminer la nature des composants, et enfin, préparer et caractériser les sols.

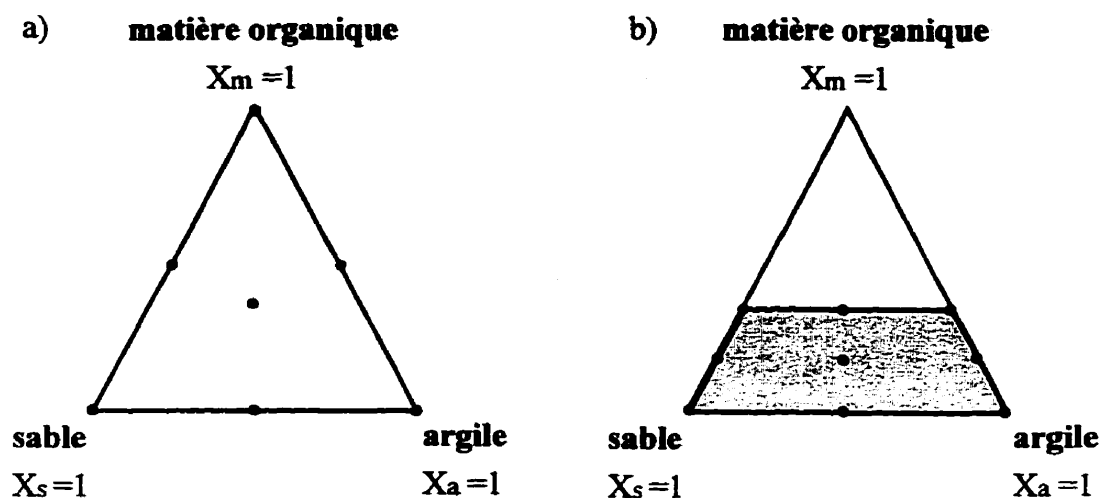
#### **3.1.1 Détermination du nombre et de la composition des sols .**

L'objectif du projet est de développer une méthodologie permettant d'obtenir une **équation de prédiction** de la réponse toxique d'un HAP en fonction de la composition du sol. Or, l'obtention d'une telle équation requiert l'utilisation d'un modèle statistique spécifiquement adapté aux mélanges. Les compositions de sol doivent donc être choisies en fonction des exigences de ce type de modèle. Cette section présente un bref résumé des outils statistiques permettant de choisir les compositions, des composants des sols et enfin, du choix des compositions.

##### **3.1.1.1 Algorithmes appliqués aux modèles de mélange**

Dans les expériences basées sur un plan d'analyse factorielle, les réponses varient habituellement en fonction de divers paramètres indépendants. Or, la particularité d'un modèle de mélange vient du fait que les paramètres indépendants représentent des proportions d'un mélange dont la somme est constante (ex: 1, 100%). Des modèles statistiques ont été développés pour tenir compte des changements entraînés par cette contrainte (Cornell, 1983; Snee, 1979). Ils reposent sur le postulat que la réponse mesurée dépend uniquement des proportions des composants et non de la quantité totale de mélange.

Pour l'application d'un modèle de mélange, les points expérimentaux (ou compositions) sont disposés, à l'aide d'algorithmes standards (simplex lattice, simplex-centroid), de façon symétrique et uniforme à l'intérieur de l'espace expérimental illustré à la figure 3.1a. Cependant, des contraintes sont souvent imposées sur la composition du mélange. L'espace expérimental dans lequel les points expérimentaux peuvent être choisis est alors restreint mais les points doivent demeurer symétriques et uniformes au sein de cet espace. La figure 3.1b illustre un exemple dans lequel une contrainte sur le contenu en matière organique limite l'espace expérimental au trapèze inférieur.



**Figure 3.1 Exemples de points expérimentaux avec et sans contraintes**

D'autres algorithmes sont alors utilisés pour définir l'emplacement des points expérimentaux et des changements de variables sont également effectués pour faciliter l'analyse statistique.

### **3.1.1.2 Composants**

Un sol naturel est constitué de 4 composants solides, en proportions diverses: du sable, du limon, de l'argile, et, dépendant de la profondeur du sol, d'une quantité plus ou moins importante de matière organique. Les sols utilisés dans le projet contiennent également ces 4 composants. Bien que le limon ne soit pas un composant à l'étude, chaque sol en contient une quantité fixe, soit 25 %. En plus de respecter la texture naturelle des sols, la présence de limon assure une meilleure homogénéité. En effet, Bastien (1997) a fait remarquer que les différences de taille entre le sable et l'argile rendent difficile l'obtention d'un mélange homogène entre ces deux composants.

### **3.1.1.3 Choix du nombre et de la composition des sols**

Les compositions de sol choisies pour la réalisation du modèle prédictif doivent engendrer des propriétés adsorbantes assez différentes pour être en mesure d'influencer la biodisponibilité du HAP sélectionné. La revue de littérature a montré que la matière organique, l'argile (entre autres par sa surface spécifique) et la porosité sont des facteurs susceptibles d'influencer la biodisponibilité des contaminants. Des sols ayant un intervalle de contenu important en matière organique et en argile devraient donc être susceptibles d'influencer différemment la biodisponibilité des contaminants.

Cependant, afin de générer un modèle susceptible d'être appliqué à des problématiques réelles, les compositions de sol doivent être représentatives de sols industriels pouvant être contaminés. La viabilité des organismes des tests de toxicité doit également être considérée pour éviter que les effets mesurés ne soient le reflet de la matrice solide. Quelques contraintes, établies à partir des éléments suivants, ont donc été imposées à l'espace expérimental dans lequel les compositions peuvent être choisies.

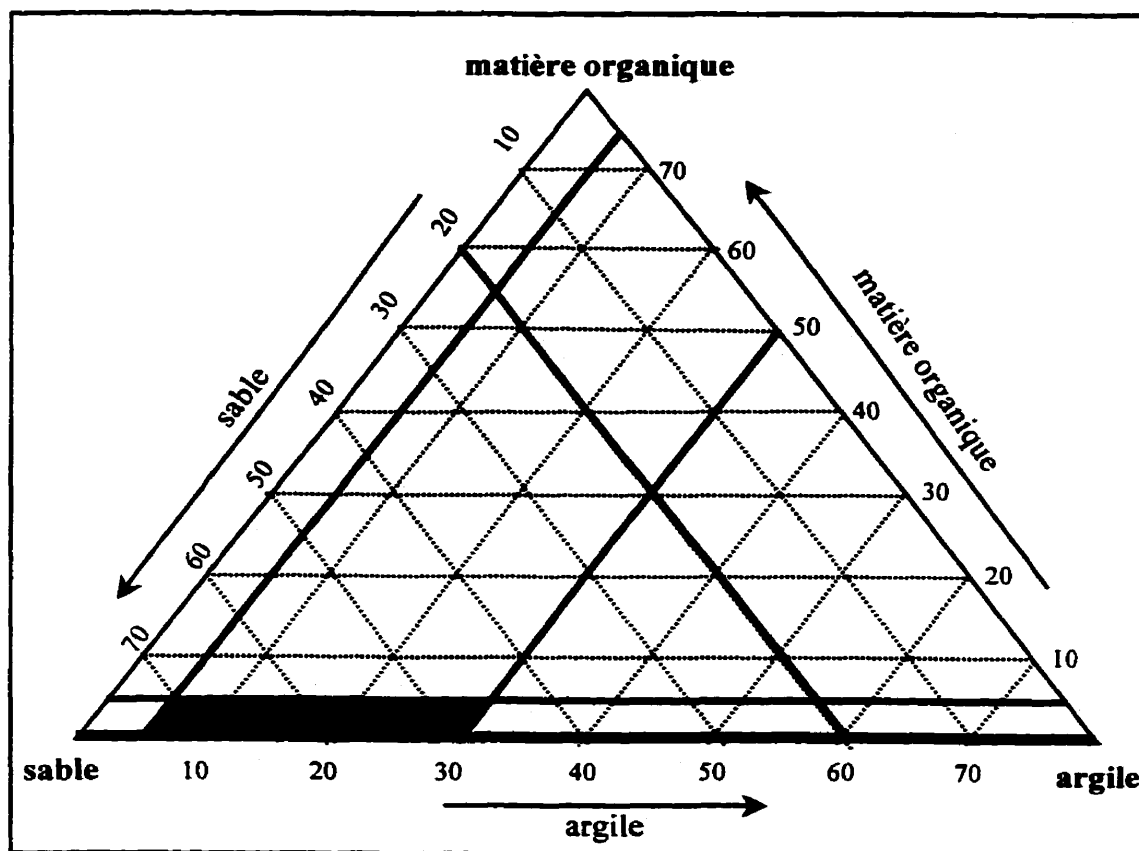
- les caractéristiques intrinsèques des sols
- une revue de littérature sur les sols utilisés dans le cadre d'essais de toxicité et d'expériences sur les cinétiques d'adsorption de contaminants organiques
- l'avis de nombreux experts dans le domaine des sols et de l'écotoxicologie

Les contraintes sur le contenu de chaque composant dans les sols sont présentées au tableau 3.1. Il est à noter que **25 % du sol est composé de limon.**

**Tableau 3.1: Contraintes sur le contenu de chaque composant dans les sols**

Composant	Limite inférieure	Limite supérieure
Matière organique	<p><b>0.5 %</b></p> <p>Le ver se nourrit de matière organique. Les sols doivent donc en contenir une quantité minimale pour assurer sa survie pendant 14 jours.</p>	<p><b>5 %</b></p> <p>Le contenu en matière organique de la couche supérieure des sols agricoles québécois oscille entre 6 et 9 % (Lafrance et Banton, 1996). Il est habituellement inférieur à ces valeurs pour les sols industriels.</p>
Argile	<p><b>5 %</b></p> <p>Un sol contient toujours une certaine quantité d'argile, même minime. Les contenus minimaux décrits par la littérature varient de 2 à 4 %.</p>	<p><b>30 %</b></p> <p>Un sol trop argileux limite le transfert de l'oxygène vers les graines, et nuit à leur respiration. Des phénomènes d'évitement ont été constatés chez le ver (Chassé, 1997; Nadeau, 1997).</p>
Sable	<p><b>20 %</b></p> <p>C'est le pourcentage minimum observé dans la littérature.</p>	<p><b>75 %</b></p> <p>Les sols trop sablonneux nuisent au ver et ne peuvent contenir une quantité importante de matière organique.</p>

Le diagramme ternaire de la figure 3.2 présente l'espace expérimental résultant des contraintes appliquées à la composition des divers sols. Les compositions doivent être choisies à l'intérieur de cet espace de façon symétrique et uniforme, et leur nombre doit permettre l'évaluation de l'effet de chaque composant pur et celui des interactions. Par ailleurs, la complexité logistique de la réalisation des essais de toxicité restreint le nombre de compositions pouvant être choisies.



**Figure 3.2: Espace expérimental**

Les compositions ont été obtenues à l'aide du logiciel STATISTICA, dans la section *Design for constrained mixtures and surfaces* du module *Experimental design*. Comme des contraintes inférieures et supérieures bornent l'espace expérimental, elles ont été déterminées à l'aide d'un algorithme tenant compte de ces contraintes et développé par Piepel (1988) et Snee (1979).

### **3.1.2 Choix de la nature des composants**

La composition des sols étant définie, la nature du limon, de l'argile, du sable et de la matière organique doit être choisie. Les limites très strictes sur la composition des sols imposent l'utilisation de sols artificiels. Ces derniers permettent en effet de contrôler le contenu des sols, autant au niveau granulométrique que minéralogique et organique. Tel que mentionné à la section 1.3.2, la nature des fractions minérale et organique du sol a une influence sur l'adsorption des contaminants. Il est donc plus facile de partitionner les effets respectifs de la texture et du contenu organique avec des composants de nature identique. Les sols artificiels ont cependant une limite importante: les interactions entre les composants d'un sol naturel soumis aux effets climatiques ne sont pas les mêmes que dans un sol artificiel. Ces interactions peuvent influencer de façon marquée les caractéristiques d'un sol (Bloom, 1997) et il devient alors difficile de prédire la biodisponibilité des contaminants dans des conditions autres que celles utilisées au laboratoire.

Afin de favoriser la standardisation des essais et leur reprise éventuelle par une tierce personne, il a d'abord été envisagé d'utiliser des composants purs, c'est-à-dire du limon, de l'argile, du sable et de la matière organique commercialisés, de composition constante et connue. Cependant, après consultation de plusieurs spécialistes en science des sols, il est apparu que le limon pur n'existe pas à l'état commercial et naturel. Il a donc été décidé d'utiliser un sol de base contenant un faible pourcentage d'argile et d'y ajouter du sable, de l'argile et de la matière organique pour parvenir aux compositions désirées. Les sections suivantes décrivent les caractéristiques du sol de base ainsi que celles des autres composants choisis.

### 3.1.2.1 Sol de base

Le sol de base a été fourni par M. Antonio Gatien, du département de génie minéral de l'École Polytechnique. Il a été échantillonné près du barrage LG2 sur la rivière La Grande (Québec, Canada) et ne contient pas de matière organique. Sa texture, évaluée par une centaine d'analyses granulométriques (département de génie minéral), est très homogène. Ceci constitue une condition essentielle, car un sol de base non homogène aurait pu entraîner un changement des propriétés adsorptives de certains sols.

En supposant que le limon comprend les particules dont le diamètre varie de 2 à 63  $\mu\text{m}$  (norme du MIT), le sol de base contient 6 % d'argile, 31 % de limon, 58 % de sable et 5 % de composés grossiers qui ont été séparés du sol de base. Ainsi, après avoir été séché pendant une nuit à l'aide d'un ventilateur, le sol a été tamisé à 1,18 mm (16 mesh). La fraction retenue par le tamis était broyée à l'aide d'un pilon pour défaire les gros agrégats puis repassée dans le tamis 16 mesh. Cette opération a été répétée jusqu'à l'obtention d'environ 80 kg de sol tamisé qui sera dénommé "LG2" pour la suite du projet.

Une analyse granulométrique a ensuite été réalisée sur le sol LG2 par le département de génie minéral selon les méthodes de l'American Society for Testing and Materials (ASTM) décrites à l'annexe A.

Certains éléments/métaux sont indispensables à la croissance des plantes et à l'alimentation animale. En quantité trop importante, ils peuvent cependant affecter la survie et le développement des organismes soumis aux essais de toxicité. Afin de s'assurer que la présence de métaux dans le sol n'affecte pas les organismes, une analyse de leurs concentrations dans le sol LG2 a été effectuée par un laboratoire externe accrédité (*Philip Analytiques*). Les métaux suivants ont été dosés à l'aide d'un spectrophotomètre d'émission à plasma d'argon ARL 3510 (type ICP): As, Ca, Mg, Na, K, Al, Ba, Be, Cd, Cr, Co, Cu, Fe, Pb, Mn, Mo, Ni, P, Ag, V, Zn, S. Le mercure a été



dosé par un analyseur de mercure (*Pharmacia Fine Chemical*). Les protocoles de ces analyses sont détaillés à l'annexe G. Hormis l'analyse de métaux, aucune analyse de la composition minéralogique n'a été effectuée sur le sol LG2.

### 3.1.2.2 Sable

Le sol LG2 contenant déjà du sable, le sable ajouté pour parvenir aux compositions voulues doit avoir une granulométrie similaire à celui du sol LG2. En effet, la quantité de sable ajoutée à chaque type de sol est différente et l'addition d'un autre type de sable introduirait un facteur supplémentaire. Le sable a donc été obtenu à partir du sol LG2, en le séparant mécaniquement du limon et de l'argile. Pour ce faire, une partie du sol LG2 a été mise dans un tamiseur automatique composé d'une série de plusieurs tamis (200 mesh, 100 mesh, 200 mesh, 230 mesh), le dernier passant 63  $\mu\text{m}$ . La fraction retenue était lavée dans un bol en acier inoxydable (3 litres) jusqu'à l'obtention d'une eau de décantation claire. Ce processus a été répété jusqu'à l'obtention d'environ 15 kg de sable dont la granulométrie a été évaluée selon les méthodes de l'ASTM décrites à l'annexe A.

### 3.1.2.3 Argile

L'argile représente un composant très important dans le cadre de ce projet. En effet, chaque type d'argile possède des caractéristiques pouvant influencer différemment l'adsorption d'un contaminant. Le choix d'une argile pure commerciale s'imposait car il est très fastidieux de séparer l'argile d'un sol des autres composants. La kaolinite a été retenue à cause de sa facilité d'approvisionnement et de son utilisation dans le sol standard de l'OCDE employé pour effectuer les tests de toxicité sur les vers (OCDE, 1984). La littérature rapporte également des cas d'adsorption de HAP sur cette argile (Karimi-Loftabad *et al.*, 1996; Huang *et al.*, 1996).

Cependant, la kaolinite contient des charges variables, plus représentatives des régions tropicales que tempérées (Robert et Chenu, 1992). À cause de la nature non polaire des HAP, cette caractéristique n'a pas autant d'importance qu'avec un contaminant polaire ou ionisable. Argile acide et peu poreuse (Foth, 1990; Huang *et al.*, 1996), sa surface spécifique varie entre 10 et 30 m<sup>2</sup>/g (Todd, 1980) et est principalement attribuable aux surfaces externes (Robert et Chenu, 1992). La caractérisation chimique de la kaolinite (EPK), fournie par le détaillant (*Sial*), est présentée au tableau 3.2.

**Tableau 3.2: Composition chimique de la kaolinite**

	SiO <sub>2</sub>	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	TiO <sub>2</sub>	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	K <sub>2</sub> O	Na <sub>2</sub> O	CaO	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	MgO	Perte au feu
%	46.5	37.62	0.36	0.51	0.4	0.02	0.25	0.19	0.16	13.77

#### 3.1.2.4 Matière organique

La matière organique a été achetée de l'International Humic Substances Society (IHSS), une organisation qui produit des acides humiques et fulviques standards. Elle se nomme "Pahokee" et a été échantillonnée à Ocachobee (Floride, États-Unis). Elle a ensuite été tamisée (2,0 mm) par l'IHSS, homogénéisée et entreposée sans un endroit sec. Comme pour le sol LG2, le contenu en métaux a été analysé par le laboratoire *Philip Analytiques* à l'aide d'un spectrophotomètre d'émission à plasma d'argon et d'un analyseur de mercure.

### **3.1.3 Préparation des sols**

Les compositions des sols et la nature des composants ayant été déterminées, les sols ont ensuite été préparés par le mélange (dans un contenant en verre) d'une quantité fixe de sol LG2 (71 %) aux différentes quantités de sable, d'argile et de matière organique permettant d'obtenir les compositions préétablies. La quantité de sol LG2 contenue dans chacun des sols a été déterminée de façon à obtenir 25 % de limon. Le sol était ensuite mélangé (par brassage du contenant) jusqu'à ce qu'il soit visuellement homogène. Les quantités respectives de composant à introduire pour obtenir chaque type de sol de même que les calculs effectués pour y parvenir sont présentés à l'annexe C.

Pour la suite de ce chapitre, le terme préparation de sol réfère à la constitution d'un des types de sol à un temps donné.

### **3.1.4 Caractérisation physico-chimique des sols**

Plusieurs caractéristiques doivent être évaluées pour connaître les propriétés de chaque sol. La connaissance du pH, de la teneur en eau et de la capacité de rétention en eau permettra d'ajuster les paramètres pour la réalisation des essais de toxicité. L'évaluation de la surface spécifique et de la porosité des sols, deux facteurs importants pour l'adsorption sur la composante minérale, permettra quant à elle d'expliquer les différences de toxicité observées dans chacun des types de sol lors de l'élaboration d'un modèle de prédiction.

Le tableau 3.3 résume le nombre de préparations de sols testées pour chacune des caractérisations, le nombre de réplicats par préparation de sol, ainsi que numéro du protocole. Chacun des paramètres a été évalué sur chaque type de sol et certains sur les composants purs.

**Tableau 3.3: Nombre de répliquats pour chaque essai de caractérisation des sols**

	<b>Nbre de préparations de sol</b>	<b>Nbre de répliquats par préparation de sol</b>	<b>Constituants purs</b>	<b>No. de protocole</b>
pH	2	3	non	A2
Teneur en eau	1	3	oui	A3
Capacité de rétention	3	1	non	A4
Porosité	2	1	non	A5
Surface spécifique	2	2	oui	A5

L'ensemble des protocoles utilisés pour caractériser les sols sont présentés à l'annexe A et le principe général des analyses de porosimétrie et de surface spécifique sont détaillées ci-dessous.

La porosité des sols a été déterminée à l'aide d'un porosimètre au mercure (PoreSizer 9320). Cette méthode évalue le volume des pores et leur distribution de taille par injection de mercure dans un échantillon de sol. Le volume de mercure pénétrant dans les pores est mesuré en fonction de la pression exercée. Ces deux données sont ensuite utilisées pour caractériser la distribution des pores.

La surface spécifique des sols a été évaluée à l'aide d'un appareil (type Flowsorb 2300) dont le fonctionnement est basé sur la théorie de Brunauer, Emmett et Teller (1938), plus communément appelée BET. Cette méthode évalue la surface spécifique d'un échantillon en déterminant la quantité d'azote qui s'y adsorbe. Ainsi, le sol est traversé par un courant gazeux contenant 30 % d'azote et 70 % d'hélium, le gaz porteur. Il est ensuite refroidi à  $-195^{\circ}\text{C}$  à l'aide d'azote liquide pour permettre l'adsorption de l'azote du courant gazeux sur la surface et dans les pores du sol. Deux cellules conductrices détectent la différence d'azote entre les courants entrant et sortant de l'échantillon. En supposant que l'adsorption se produit en monocouche et en connaissant le volume total

occupé par une molécule d'azote, il est alors possible de calculer la surface spécifique du sol. Pour fin de comparaison, la surface a également été évaluée à l'aide des analyses porosimétriques en posant l'hypothèse que les pores ont la forme de capillaires cylindriques. L'aire imputable à un certain diamètre de pore est mesurée par l'équation  $A = 4V/D$  où le volume (V) et le diamètre (D) des pores sont connus. On obtient l'aire spécifique totale en additionnant les aires engendrées par chacun des diamètres.

### **3.1.5 Détermination de l'influence de la matrice de sol sur les organismes des tests de toxicité**

Afin de vérifier que la composition des sols n'influence pas la réponse des organismes des tests de toxicité, des essais ont été effectués sur l'ensemble des compositions de sols **non contaminés**. En effet, il est possible que les sols argileux nuisent à la respiration des graines et engendrent un phénomène d'évitement chez les vers. La faible quantité de matière organique de certains sols peut également s'avérer insuffisante pour assurer les conditions optimales de vie des vers.

Quarante graines d'orge (un réplicat) et 10 vers (5 réplicats) ont été exposés à chacun des sols non contaminés hydratés selon les spécifications des tests de toxicité (voir annexe F). Les protocoles standards décrivant les tests de toxicité utilisés dans l'ensemble du projet et la composition des témoins auxquels les réponses toxiques ont été comparées sont présentés ci-dessous. Ces tests ont été effectués à l'Institut de Recherche en Biotechnologie (IRB).

### 3.1.5.1 Mortalité du ver *Eisenia foetida*

La méthode utilisée pour estimer la létalité du ver *Eisenia foetida* est basée sur la méthode de l'EPA (Greene *et al.*, 1989). Cette méthode a cependant été modifiée dans le cadre du projet pour tenir compte du phénomène de mortalité en cascade observé par le laboratoire d'analyse écotoxicologique *Analex* (données non publiées) et par Sheppard et Evenden (1992). En effet, il semble que la mortalité de quelques vers entraîne parfois la mortalité de l'ensemble des vers du même pot. Pour contourner ce problème, *Analex* a modifié la répartition des organismes dans les contenants d'essais, en plaçant deux vers par contenant de 120 ml au lieu de 10 vers dans un contenant de 1 L.

Dans le cadre du projet, un contenant de 120 ml (no. 1730, *Corning*), percé par une mèche 1/16, était rempli par l'équivalent de 40 g de sol sec hydraté à 75 % de sa capacité de rétention par de l'eau osmosée. Deux vers *Eisenia foetida* pesant entre 300 et 600 mg et ayant un clitellum étaient ensuite lavés, séchés et pesés ( $\pm 0,0001$  g), avant d'être mis dans un contenant de plastique dont le poids était consigné ( $\pm 0,01$  g). Sauf indication contraire, 15 répliquats étaient effectués pour chacune des concentrations ou chacun des types de sol à tester. L'ensemble des contenants était ensuite mis dans une chambre environnementale dont la température était contrôlée ( $22 \pm 2$  °C) et où une photopériode journalière de 16 h (400-700 lux) obligeait les vers à entrer en contact avec le sol. Après 7 jours, chaque contenant était pesé afin d'ajuster la teneur en eau à sa valeur initiale. Les vers morts étaient enlevés, et les pots remis dans la chambre environnementale pendant 7 jours. Les vers étaient ensuite lavés, séchés, puis pesés de nouveau. Le sol témoin standard est composé de 70 % de quartz industriel (*Unimin Canada*), 20 % de kaolinite (EPK, *Sial*) et 10 % de tourbe (Magic Worm Bedding, *Carolina Biological*).

Les résultats sont rapportés de la façon suivante:

$$\% \text{ de mortalité} = \frac{(\text{nombre de vers morts/nombre total de vers exposés})_{\text{sol testé}}}{(\text{nombre de vers morts/nombre total de vers exposés})_{\text{sol témoin}}} \times 100$$

$$\% \text{ de variation pondérale} = \frac{(\text{Poids initial des vers} - \text{Poids final des vers})}{(\text{Poids initial des vers})} \times 100$$

### 3.1.5.2 Germination et croissance de l'orge *Hordeum vulgare*

Le test de germination et croissance de l'orge *Hordeum vulgare* est basé sur le protocole de l'OCDE (1984). L'équivalent de 100 g de sol sec hydraté à 85 % de sa capacité de rétention en eau était d'abord mis dans un pétri (no.3025). Quarante graines d'orge (*Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec*, 1996) de taille semblable et ne présentant pas d'altération visible étaient uniformément déposées dans le sol. Ce dernier était ensuite recouvert de 90 g de quartz industriel 16 mesh (*Unimin Canada*). Sauf indication contraire, trois réplicats étaient effectués pour chacune des concentrations ou des types de sol à tester. Les pétris étaient recouverts d'un sac en polyéthylène (30 \* 40 cm) refermé avec un élastique, de façon à laisser assez d'espace pour permettre la croissance des pousses d'orge tout en limitant les échanges gazeux avec l'extérieur. Ils étaient ensuite placés à l'obscurité dans une chambre environnementale où la température était maintenue à  $24 \pm 2$  °C. Après 48 h, les graines subissaient une photopériode journalière de 16 h ( $4300 \pm 400$  lux). Les graines germées étaient dénombrées après 5 et 14 jours. À 14 jours, les pousses étaient soigneusement récoltées et séchées à 105°C pendant 16 heures, avant d'être pesées. Le témoin standard est composé de 100 g de quartz industriel 20 mesh recouverts de 90 g de quartz industriel 16 mesh.

Les résultats sont rapportés de la façon suivante:

$$\% \text{ de germination} = \frac{(\text{nbre de graines germées/nbre de graines exposées})_{\text{sol testé}}}{(\text{nbre de graines germées/nbre de graines exposées})_{\text{sol témoin}}} \times 100$$

$$\% \text{ de biomasse totale} = \frac{(\text{poids total des pousses})_{\text{sol testé}}}{(\text{poids total des pousses})_{\text{sol témoin}}} \times 100$$

$$\% \text{ de biomasse individuelle} = \% \text{ de biomasse totale} \times \frac{(\text{nbre de graines poussées})_{\text{sol témoin}}}{(\text{nbre de graines poussées})_{\text{sol testé}}}$$

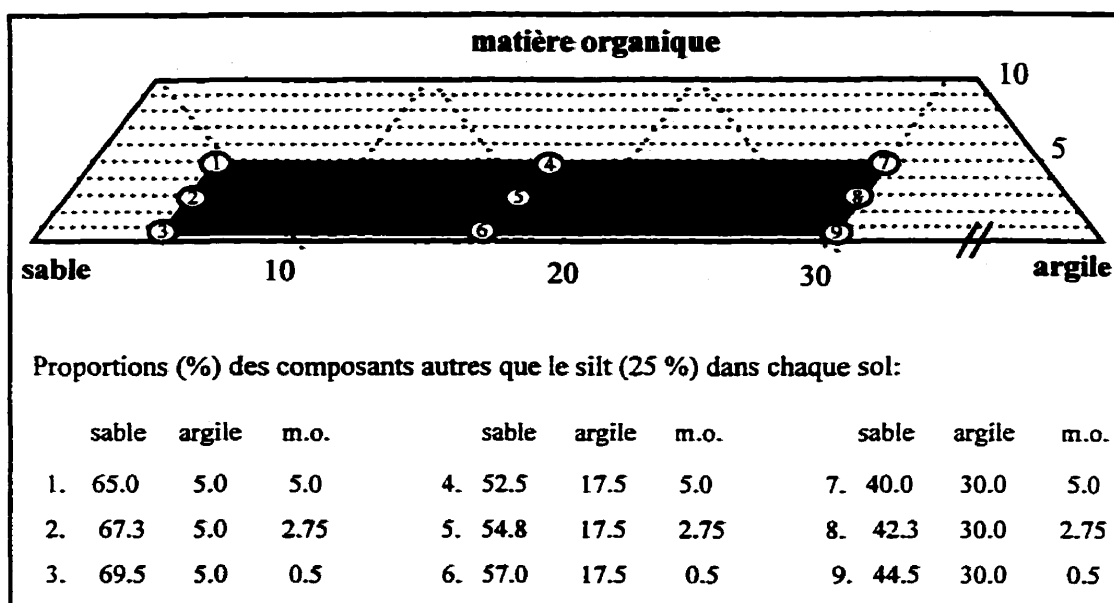
## 3.2 RÉSULTATS ET DISCUSSION

Cette section présente en premier lieu le nombre et la composition des sols choisis pour l'élaboration d'un modèle prédictif. Les résultats obtenus de la caractérisation des composants purs et des différents types de sol sont ensuite détaillés.

### 3.2.1 Nombre et composition des sols

L'utilisation d'un algorithme adapté aux modèles de mélange a permis de déterminer le nombre et la composition des sols utilisés. Le logiciel STATISTICA propose deux plans expérimentaux, l'un contenant 5 compositions de sol, soit les sols 1, 3, 5, 7 et 9 de la figure 3.3 et l'autre 9 compositions de sol.





**Figure 3.3: Compositions des différents types de sol**

Le plan à 9 compositions a été préféré à celui à 5 compositions, car il permet de mieux discriminer les effets de chaque composant. Les 9 types de sol peuvent être séparés en 3 classes texturales identifiées par des couleurs différentes sur l'ensemble des graphiques de cette section. Au sein de chacune des classes présentées ci-dessous, seul le contenu en matière organique diffère.

- une classe sablonneuse, contenant les sols 1, 2, et 3 (□),
- une classe contenant les quantités médianes d'argile et de sable. Cette classe sera dénommée médiane pour la suite du projet et comprend les sols 4, 5 et 6 (▨),
- une classe argileuse contenant les sols, 7, 8 et 9 (■).

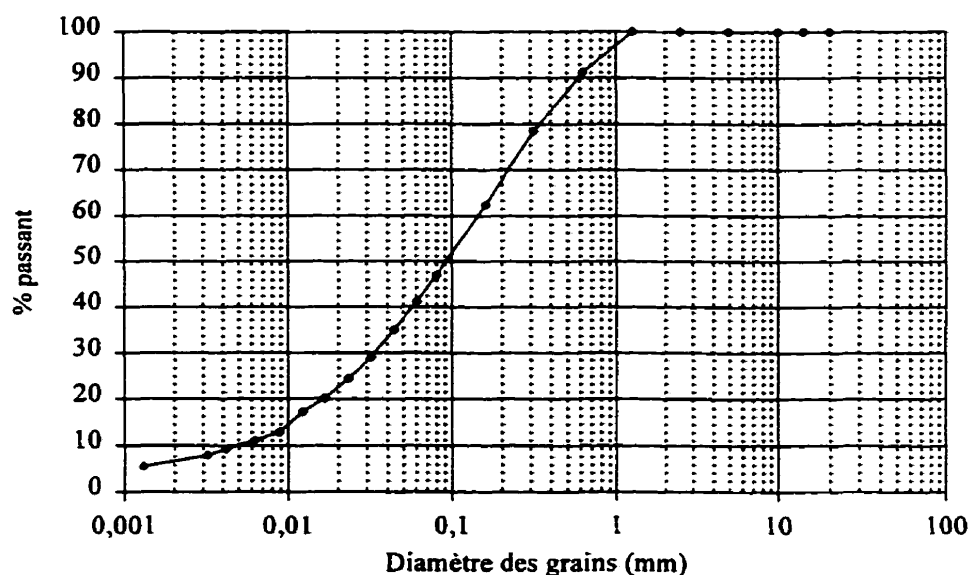
Tous les sols contiennent 5 % d'argile provenant du sol LG2 et cette argile n'est pas de la kaolinite. Comme la quantité d'argile des sols sablonneux est de 5 %, il n'y a pas d'ajout de kaolinite. Les classes médianes et argileuses contiennent donc deux types d'argile.

### 3.2.2 Caractéristiques des composants purs

Afin de connaître la texture et le contenu en métaux des composants purs, des analyses granulométriques et chimiques ont été effectuées (voir section 3.1.2). Les résultats reliés à la caractérisation du sol LG2, du sable et de la matière organique sont présentés dans cette section.

#### 3.2.2.1 Sol LG2

La granulométrie du sol de base tamisé (sol LG2) est présentée à la figure 3.4. Le sol LG2 contient 7 % d'argile, 35 % de limon et 56 % de sable (norme du MTT) (Winegardner, 1996).



**Figure 3.4: Granulométrie du sol LG2**

Les métaux contenus dans le sol LG2 sont détaillés à l'annexe B. Les concentrations sont toutes inférieures au critère A du MEF (la teneur de fond habituellement rencontrée dans les sols) et ne devraient donc pas influencer la réponse toxique des organismes soumis aux tests de toxicité. Pour s'en assurer, elles ont été comparées aux

concentrations ne causant aucun effet (NOEC: No Observed Effect Concentration) sur les vers de terre pour des métaux réputés toxiques et pour lesquels les NOEC sont disponibles dans la littérature.

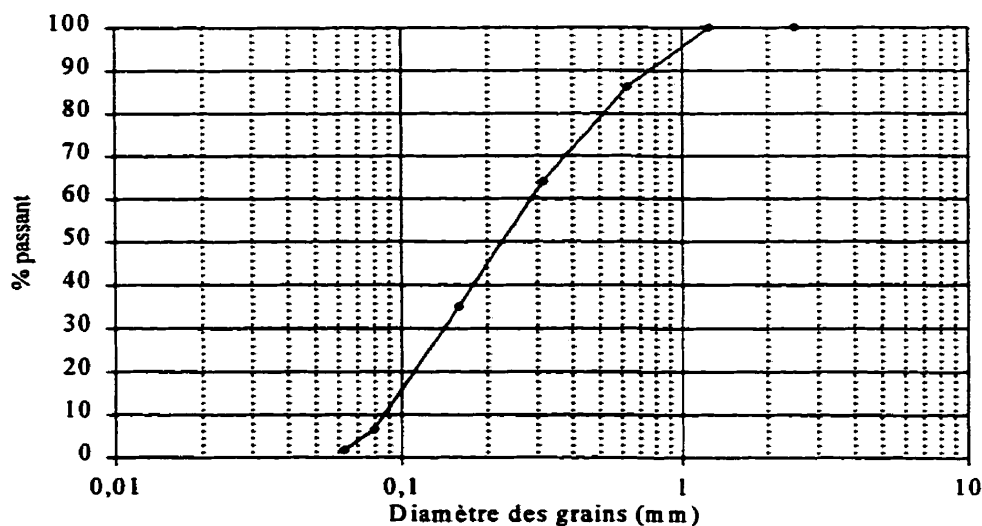
**Tableau 3.4: Comparaison entre les concentrations en métaux dans le sol LG2 et les NOEC pour les vers de terre**

Métal	Concentration sol LG2 (mg/kg de sol sec)	NOEC (mg/kg de sol sec)	Espèce de ver et paramètre mesuré	Référence
Cadmium	<1	10	<i>E. andrei</i> croissance	van Gestel <i>et al.</i> 1991b
Chrome	19	10	<i>E. andrei</i> croissance	van Gestel <i>et al.</i> 1992
Cuivre	8	1000	<i>E. foetida</i> croissance	Neuhauser <i>et al.</i> , 1984
Mercure	<0.02	2.5	<i>E. foetida</i> survie	Beyer <i>et al.</i> , 1985
Nickel	4	100	<i>E. foetida</i> reproduction	Malecki <i>et al.</i> , 1982
Zinc	11	223	<i>E. foetida</i> reproduction	Spurgeon et Hopkin, 1996

La comparaison effectuée au tableau 3.4 montre que les concentrations de métaux dans le sol LG2 sont toutes, à l'exception du chrome, largement inférieures à celles où aucun effet sur le ver n'a été rapporté dans la littérature. Dans le cas du chrome, la plus faible concentration où un effet sur la croissance a été observé est de 32 mg/kg de sol sec (van Gestel *et al.*, 1991b). Il est donc possible que la présence de chrome dans le sol LG2 ait un impact sur le ver *Eisenia foetida*. Si cet impact est marqué, il sera détecté lors des tests sur l'influence de la matrice de sol sur les organismes des tests de toxicité (voir section 3.2.4).

### 3.2.2.2 Sable

La figure 3.5 illustre la granulométrie du sable obtenu par tamisage et lavage du sol LG2.



**Figure 3.5: Granulométrie du sable séparé mécaniquement du sol LG2**

Le sable contient environ 1 à 2 % de sol passant 63  $\mu\text{m}$ , donc une faible quantité de limon et/ou d'argile. Ces impuretés ne seront pas prises en compte dans les calculs ultérieurs.

### 3.2.2.3 Matière organique

Les résultats bruts obtenus lors du balayage des métaux contenus dans la matière organique sont présentés à l'annexe B. Seul le contenu en sélénium (1,7 mg/kg de sol sec) dépasse légèrement la valeur du critère A établi par le MEF (1 mg/kg de sol sec). Cependant, la matière organique ne constituant qu'une proportion maximum de 5 % des sols, la présence de sélénium ne devrait pas influencer les réponses des organismes des tests de toxicité. Les concentrations en cadmium, chrome, cuivre, mercure, nickel et zinc, sont inférieures aux concentrations où aucun effet sur le ver n'a été observé (NOEC) (voir tableau 3.4).

### 3.2.3 Caractéristiques physico-chimiques des 9 types de sol

Afin d'ajuster les conditions environnementales pour la réalisation des tests de toxicité (pH, teneur en eau), le pH, la teneur en eau et la capacité de rétention des 9 types de sol ont été évaluées. La porosité et la surface spécifique ont également été mesurées pour connaître les propriétés adsorbantes de chaque type de sol (voir section 3.1.4). Les résultats de ces analyses sont présentés dans cette section.

#### 3.2.3.1 pH, teneur en eau et capacité de rétention des 9 types de sol

Les pH, les teneurs en eau et les capacités de rétention des 9 types de sol sont présentés au tableau 3.5. Les sols 1,4, et 7 contiennent 5 % de matière organique, les sols 2, 5, et 8, 2.75 %, et les sols 3, 6 et 9, 0.5 %.

**Tableau 3.5: pH, teneur en eau et capacité de rétention ( $\pm$  é.t.) des 9 types de sol**

Type de sol	pH (n = 6)	Teneur en eau (%) (n= 3)	Capacité de rétention (%) (n=3)
1	6.27 $\pm$ 0.18	0.50 $\pm$ 0.03	24.3 $\pm$ 0.9
2	6.26 $\pm$ 0.07	0.32 $\pm$ 0.02	23.1 $\pm$ 0.5
3	6.65 $\pm$ 0.06	0.15 $\pm$ 0.01	17.7 $\pm$ 0.7
4	6.00 $\pm$ 0.11	0.67 $\pm$ 0.03	27.4 $\pm$ 0.4
5	6.08 $\pm$ 0.16	0.36 $\pm$ 0.06	26.7 $\pm$ 0.1
6	6.09 $\pm$ 0.16	0.19 $\pm$ 0.00	24.0 $\pm$ 0.6
7	5.79 $\pm$ 0.08	1.07 $\pm$ 0.07	35.2 $\pm$ 0.8
8	5.79 $\pm$ 0.05	0.58 $\pm$ 0.05	35.0 $\pm$ 0.6
9	5.70 $\pm$ 0.10	0.28 $\pm$ 0.03	33.4 $\pm$ 0.5

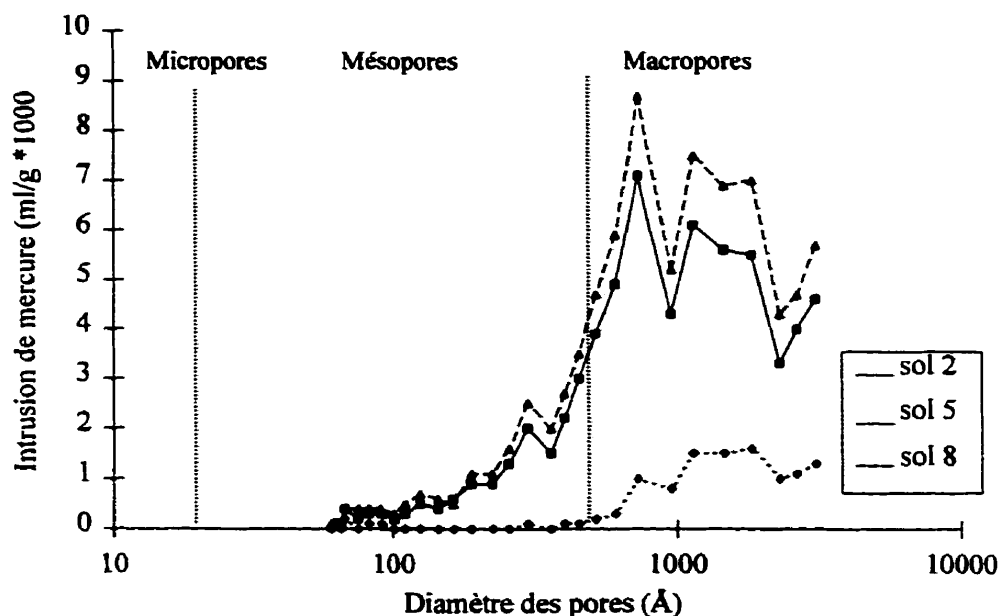
Tel que montré au tableau 3.5, une augmentation du contenu en argile a pour effet de diminuer le pH des sols, la kaolinite étant une argile acide (Foth,1990). Par ailleurs, l'augmentation du contenu en matière organique ne semble pas diminuer le pH au sein d'une même classe texturale, ce qui est contraire aux observations retrouvées dans la littérature (Sposito, 1989). La faible différence de contenu en matière organique pourrait expliquer cette observation. Le pH des sols ne sera pas ajusté lors de la réalisation des tests de toxicité, car leur valeur est incluse dans l'intervalle prescrit par les spécifications des tests (orge:  $5,0 < \text{pH} < 7,5$ , ver:  $6,0 \pm 0,5$ ). Seul le pH du sol 3 dépasse légèrement l'intervalle prescrit pour le ver. Comme l'OCDE stipule que le ver *Eisenia foetida* n'est pas affecté par des pH inférieurs à 8, le pH de ce sol ne sera pas ajusté.

Le tableau 3.5 montre que les teneurs en eau des sols sont très faibles, la plus élevée dépassant à peine 1 %. Cependant, deux tendances se démarquent nettement: une augmentation du contenu en matière organique et en argile des sols augmente leur teneur en eau. Le contenu en eau des composants purs a donc été déterminé afin de vérifier ce constat. La matière organique et l'argile contiennent respectivement 5 et 1% d'eau, ce qui est beaucoup plus élevé que le sable (0,07 %) et le sol LG2 (0,15%). Ces teneurs en eau ont été considérées lors de la préparation des sols décrite à la section (3.1.3) et chaque composant du mélange a été ajouté sur une base sèche (voir annexe C).

L'augmentation du contenu en argile et en matière organique dans le sol augmente la capacité de rétention des sols de façon marquée, un fait confirmé par la littérature (Robert et Chenu, 1992; Foth, 1990).

### 3.2.3.2 Porosité

La figure 3.6 illustre la porosité de 3 sols (2, 5, 8) représentant chacune des classes texturales (voir section 3.2.1). Le volume d'intrusion de mercure de l'axe des Y est directement proportionnel au volume de pores à un diamètre donné. Les résultats obtenus sont similaires à l'intérieur de chaque classe de sols. La matière organique n'a donc pas d'influence sur la porosité des sols ou la méthode utilisée ne permet pas de montrer cette influence.



**Figure 3.6: Porosité des sols 2, 5 et 8 (n=1)**

Cette figure montre que le sol de la classe sablonneuse (sol 2) ne contient pratiquement pas de mésopores, comparativement aux sols des classes médiane et argileuse. Il est important de rappeler que contrairement aux deux autres classes, il n'y a pas eu d'ajout de kaolinite dans la classe sablonneuse. Les courbes des sols 5 et 8 sont pratiquement similaires, bien que le sol 8 contienne un peu plus de pores de chaque diamètre. Il semble

donc que malgré le fait que la littérature rapporte que la kaolinite est une argile peu poreuse (Foth, 1990; Huang *et al.*, 1996), elle présente toutefois une certaine mésoporosité.

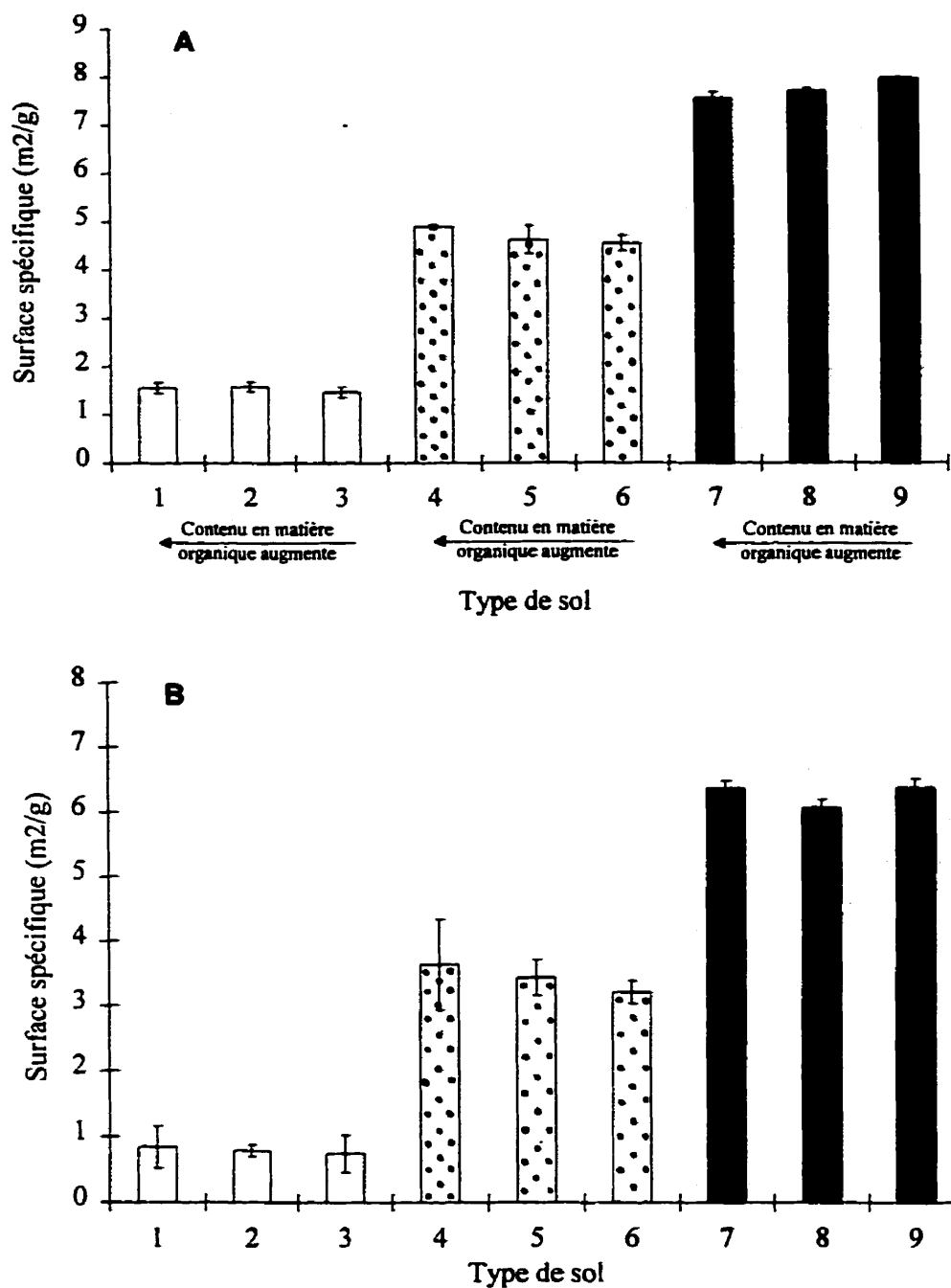
Les outils analytiques ne permettent malheureusement pas de déceler la présence des micropores, celles ayant le plus d'influence sur l'adsorption (Farrel et Reinhard, 1994). Il est difficile de spéculer sur leur existence dans les sols. Ces résultats permettent toutefois de conclure que la kaolinite augmente la porosité des sols et que l'adsorption devrait être favorisée dans les sols qui en contiennent.

### **3.2.3.3 Surfaces spécifiques**

La figure 3.7 présente les valeurs des surfaces spécifiques obtenues par la méthode des BET et par porosimétrie. Les deux méthodes présentent des résultats aux tendances similaires. Ainsi, le contenu en argile augmente nettement la surface spécifique des sols, une observation confirmée par la littérature (Robert et Chenu, 1992). Ce paramètre confirme que les sols choisis possèdent des propriétés adsorbantes différentes. Ainsi, l'adsorption des contaminants risque d'être favorisée dans les sols ayant une importante surface spécifique, entraînant une diminution de la biodisponibilité du contaminant.

Les résultats obtenus par porosimétrie demeurent par ailleurs nettement inférieurs à ceux obtenus par la méthode des BET. Ceci suggère que les sols contiennent de plus petits pores que ceux présentés à la figure 3.6 et que ces derniers ne sont pas accessibles au mercure. La surface spécifique qui leur est associée ne peut donc être évaluée.





**Figure 3.7: Surface spécifique ( $\pm$  é.t.) des 9 types de sol. mesurée par:**  
a) BET (n=4) b) porosimétrie (n=2);   classe sablonneuse; •• classe médiane;   classe argileuse.

Afin de mieux définir l'influence de chaque composant pur sur la surface spécifique, leur surface a été évaluée (voir tableau 3.6).

**Tableau 3.6: Surfaces spécifiques ( $\pm$  é-t.) des composants purs**

Composant	Surface spécifique ( $\text{m}^2/\text{g}$ ) $\pm$ écart-type
Sol de base (n=1)	2.15
Sable (n=2)	$0.36 \pm 0.00$
Argile (n=2)	$24.4 \pm 0.2$
Matière organique (n=2)	$0.69 \pm 0.06$

L'argile présente une surface spécifique du même ordre de grandeur que celle retrouvée dans la littérature ( $10\text{-}30 \text{ m}^2/\text{g}$ ) (Todd, 1980). Cependant, la surface spécifique de la matière organique est très faible. Ce résultat est en accord avec ceux de Chiou (1990) qui a obtenu des valeurs de  $0,61$  et  $0,73 \text{ m}^2/\text{g}$  pour deux types de matière organique dont la surface a également été mesurée avec la méthode des BET. Or, certains auteurs rapportent des surfaces spécifiques de l'ordre de  $500$  à  $800 \text{ m}^2/\text{g}$  lorsque mesurées avec des solvants polaires comme l'éthylène glycol (Bower et Gschwend, 1952). Ceci s'explique en partie par le chauffage préalable de la matière organique qui peut causer le rétrécissement des polymères organiques, diminuant ainsi la surface spécifique. Cette hypothèse est vérifiée par le fait que la matière organique séchée par le vide présente des surfaces spécifiques plus élevées car la structure est gardée intacte (Pennell *et al.*, 1992). Le séchage de la matière organique entraîne également l'orientation des groupes fonctionnels polaires vers l'intérieur de la structure et les surfaces externes deviendraient ainsi hydrophobes. L'adsorption de l'azote, molécule non polaire, s'effectuerait donc uniquement sur les surfaces externes tandis qu'un solvant comme l'éthylène glycol aurait la propriété de s'adsorber dans les surfaces internes (Pennell *et al.*, 1992).

### 3.2.4 Influence de la matrice de sol sur les organismes des tests de toxicité

Afin de déterminer si la matrice de sol peut introduire un biais dans les réponses toxiques de l'orge (*H. vulgare*) et du ver (*E. foetida*), des tests de toxicité ont été effectués sur les 9 types de sol non contaminés. La figure 3.8 montre que les sols ne semblent pas inhiber la croissance ni la germination de l'orge, bien la valeur mesurée pour la croissance soit inférieure à celle obtenue dans le témoin standard du laboratoire. Le pourcentage de germination le plus faible (87,5 %) est toutefois supérieur au pourcentage minimal prescrit pour la validation d'un test (85 %).

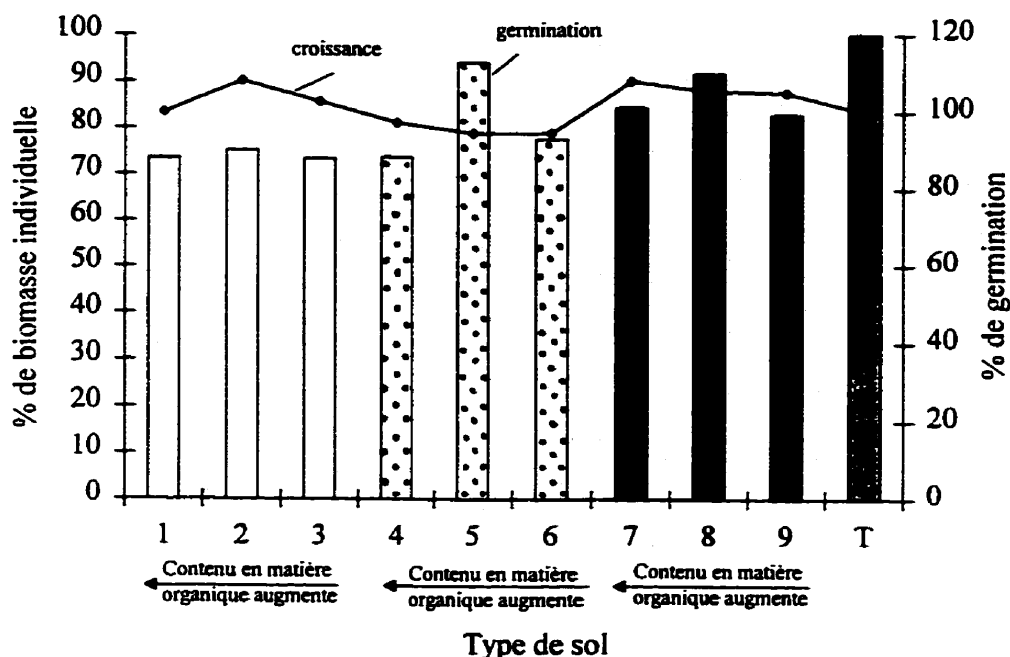
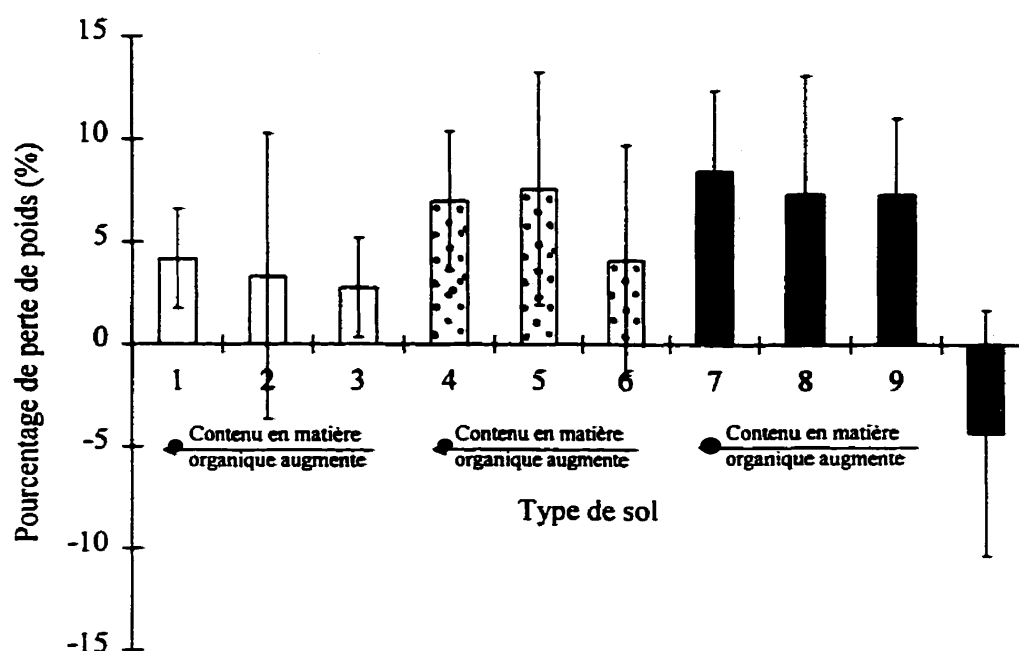


Figure 3.8: Germination et croissance de l'orge *H. vulgare* dans les 9 types de sol non contaminés (n=1). □ classe sablonneuse; ▤ classe médiane; ■ classe argileuse.

Les 9 types de sol n'ont causé aucune mortalité chez les vers, sur une durée de 14 jours. La figure 3.9 présente les pertes pondérales des vers dans les 9 sols. Il n'y a pas eu de phénomène d'évitement de la part des vers dans les sols argileux bien qu'ils y aient perdu plus de poids que dans les autres sols.



**Figure 3.9: Perte de poids des vers *E. foetida* ( $\pm$  é.t.) dans les 9 types de sol non contaminés (n=4).** □ classe sablonneuse; ▤ classe médiane; ■ classe argileuse.

Les 9 types de sol ne semblent donc pas, à la lumière de ces résultats, présenter d'effets nuisible sur l'orge et le ver. Ils satisfont ainsi une condition importante pour l'élaboration d'un modèle de prédiction de la toxicité. De plus, lors de l'élaboration du modèle prédictif, les réponses toxiques observées seront comparées à celles obtenues avec des sols de composition identique non contaminés.

### 3.3 CONCLUSION

Le plan expérimental développé au cours de ce chapitre a permis de choisir 9 sols pour l'élaboration d'un modèle prédictif. Leur contenu en matière organique et en argile varie de 0,5 à 5 % et 5 à 30 % respectivement. Les sols sont préparés à partir d'un sol de base (limon, sable, argile), auquel sont ajoutés de la matière organique et de la kaolinite commerciales, de même que du sable séparé du sol de base par sédimentation et lavage.

Des essais de toxicité ont permis de s'assurer de l'innocuité des matrices de sol pour l'orge (*H. vulgare*) et le ver (*E. foetida*), et les analyses de surface spécifique et de porosité ont mis en évidence que seule l'argile a une influence sur ces paramètres. Ainsi, la surface spécifique des sols augmente de 1,5 à 7,9 m<sup>2</sup>/g avec une augmentation du contenu en argile de 5 à 30 %, et les sols argileux sont plus mésoporeux. Les sols présentent des caractéristiques assez différentes qui devraient influencer l'adsorption des contaminants lors des essais visant l'élaboration d'un modèle prédictif.

## **CHAPITRE IV**

### **SÉLECTION DU CONTAMINANT**

*Les sols étant composés et caractérisés, un contaminant peu volatil et toxique pour les organismes des tests de toxicité doit être choisi. Ce chapitre résume les expériences effectuées sur une sélection de HAP en vue de déterminer lequel est le plus approprié pour la réalisation d'un modèle prédictif. Il vise également à mettre au point la démarche utilisée pour la préparation des sols contaminés. Y sont donc présentées les manipulations effectuées pour évaluer la volatilité et la toxicité de quelques HAP et du solvant, de même que les résultats obtenus.*

*L'objectif principal demeure cependant la détermination de la CE<sub>50</sub> du contaminant choisi pour les organismes des tests de toxicité, concentration par laquelle les 9 types de sol définis au chapitre précédent seront contaminés lors de l'élaboration d'un modèle prédictif.*

## 4.1 MATÉRIEL ET MÉTHODES

Cette section présente l'ensemble des démarches effectuées pour sélectionner un contaminant approprié pour la réalisation du modèle de prédiction. En plus de présenter un intérêt industriel, ce contaminant organique non polaire doit posséder les caractéristiques présentées au tableau 4.1.

**Tableau 4.1: Caractéristiques du contaminant choisi**

Caractéristique	Justification
Toxique pour les organismes des tests	Mettre en évidence des différences de toxicité entre les 9 types de sol.
Faible volatilité	Assurer une concentration homogène et constante dans le temps.
Faible biodégradabilité	Assurer une concentration homogène et constante dans le temps.
Hydrophobe, Kow élevé	Favoriser les interactions avec le sol.

Pour augmenter la précision du modèle prédictif, les organismes des tests de toxicité doivent être particulièrement sensibles au contaminant choisi. La volatilité et la biodégradabilité sont également des propriétés importantes, car elles peuvent se manifester différemment selon le type de sol et introduire un biais important dans les réponses toxiques observées. Par exemple, la volatilité dans les sols sablonneux risque d'être plus élevée que dans les sols argileux et la biodégradation favorisée dans les sols contenant plus de matière organique.

Les HAP contenant 3 ou 4 cycles benzéniques représentent une gamme de composés respectant les caractéristiques énoncées au tableau 4.1. En effet, le naphthalène (2 cycles) est très volatil (tension de vapeur: 31 mmHg), et les HAP de masse moléculaire plus élevée (ex :benzo(a)pyrène) risquent de s'adsorber sur l'ensemble des types de sol à cause de leur importante hydrophobicité. Il pourrait alors s'avérer difficile d'observer une différence de toxicité entre les divers types de sol.

Quatre HAP non cancérigènes (CNRC, 1985) ont été étudiés dans le but de choisir le plus approprié pour la réalisation du modèle prédictif: le pyrène (4 cycles benzéniques), le fluorène (3), l'acénaphthène (3) et le phénanthrène (3). Cette absence de cancérogénicité permettait de réduire le risque relié à la manipulation des contaminants. Le tableau 4.3 présente leurs principales caractéristiques, évaluées en fonction des critères de l'EPA résumés au tableau 4.2.




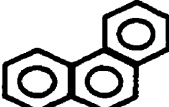
**Tableau 4.2: Critères quantitatifs pour caractériser les contaminants**

	<b>Mobilité</b> Solubilité aqueuse mg/l	<b>Volatilité</b> Tension de vapeur mmHg	<b>Hydrophobicité</b> log Kco
Faible (-)	=1,00	= 1,00 E-03	= 2,2
Modérée (±)	> 1,00 < 1,00 E+03	> 1,00 E-03 < 1,00 E+00	> 2,2 < 3,2
Élevée (+)	=1,00 E+03	= 1,00 E+00	= 3,2

tiré de EPA (1991)



**Tableau 4.3: Caractéristiques chimiques des 4 HAP étudiés**

	Structure	Solubilité dans l'eau (mg/l)	Tension de vapeur ( mmHg, 25 °C)	log K <sub>oc</sub>
Pyrène		0,148 (-)	6,67 E-06 (-)	4,58 (+)
Acénaphthène		3,88 (±)	2,31 E-02 (±)	3,7 (+)
Fluorène		1,90 (±)	6,67 E-04 (-)	3,9 (+)
Phénanthrène		1,18 (±)	2,01 E-04 (-)	4,1 (+)

tiré de EPA (1991)

Les données du tableau 4.3 mettent en évidence le fait que les 4 HAP étudiés sont hydrophobes et peu volatils, hormis l'acénaphthène qui est modérément volatil. De plus, le pyrène est moins soluble et donc moins mobile que les autres contaminants. D'autres informations doivent cependant être obtenues concernant la toxicité de ces HAP et leur devenir dans les sols utilisés dans le projet. Tel que montré au tableau 4.1, la biodégradation et la volatilisation sont les deux principaux facteurs susceptibles d'influencer la concentration du contaminant dans le temps. Or, l'utilisation de sols artificiels rend peu probable la présence d'une microflore pouvant dégrader les HAP. Dans le cadre de cette étude, uniquement la volatilité des contaminants est donc vérifiée. La biodégradabilité du contaminant choisi devra cependant être évaluée avant l'élaboration du modèle prédictif.

La volatilité et la toxicité seront donc étudiées dans les mêmes conditions expérimentales qui prévaudront lors des essais de modélisation. Pour des raisons de logistique et financières, **l'ensemble de l'expérimentation sera réalisé uniquement sur le sol 5, le centroïde du plan expérimental.** En effet, ce sol contient les quantités médianes de matière organique et d'argile. Il est donc supposé que la toxicité et la volatilité d'un contaminant dans ce sol y sont également médianes.

Après avoir traité du choix du solvant, les prochaines sections décrivent les démarches effectuées pour quantifier la toxicité et la volatilité des 4 HAP à l'étude et du solvant dans le sol 5. Dans cette section, toutes les concentrations sont exprimées sur une base de sol sec.

#### **4.1.1 Choix du solvant**

La contamination artificielle d'un sol implique souvent de très faibles quantités de contaminant. Afin d'assurer une contamination homogène, le composé est habituellement dissous dans un solvant. Plusieurs solvants sont utilisés lors de la contamination de sols par des HAP: le cyclohexane (Maliszewska-Kordybach, 1993), le dichlorométhane (White *et al.*, 1997), l'acétone (Neuhauser *et al.*, 1985, Wildi *et al.*, 1994) et le méthanol (Park *et al.*, 1989).

Dans le cadre du projet, le solvant choisi doit être très volatil et non toxique, aux concentrations résiduelles, pour les organismes des tests. Le cyclohexane, le dichlorométhane et le méthanol sont classés relativement non toxiques pour le ver *E. foetida*, alors que l'acétone est modérément toxique (Roberts et Dorrough, 1984). Cette dernière a tout de même été choisie pour son important pouvoir de dissolution des HAP qui permet une contamination avec une quantité réduite de solvant. L'acétone a été utilisée lors de toutes les contaminations de sol de ce chapitre.

En plus de modifier la solubilité des HAP et la structure de la matière organique, la présence d'une quantité résiduelle de cosolvant dans le sol peut affecter les organismes des tests de toxicité. Pour évaluer cette influence, la toxicité et la volatilité de l'acétone sont évaluées dans les deux prochaines sections.

#### 4.1.2 Évaluation de la toxicité des HAP et du solvant

Aucune donnée de toxicité n'a pu être répertoriée pour les HAP purs à l'égard de la germination et la croissance de l'orge *H. vulgare*, ni pour toute autre espèce de plante. Pour le test avec ver de terre, la littérature ne rapporte aucune donnée de toxicité pour le phénanthrène et le pyrène mais Neuhauser *et al.* (1984) ont évalué la  $CL_{50}$  du fluorène à 173 mg/kg pour *E. foetida*. Un test de contact sur le fluorène et l'acénaphthène leur a également permis de conclure que l'acénaphthène était plus toxique. Étant donné le manque d'informations sur la toxicité des HAP purs, les intervalles de concentrations testées sont assez élevés, sauf dans le cas du fluorène et de l'acénaphthène.

L'évaluation de la toxicité des contaminants comporte deux étapes: la préparation des sols contaminés et la réalisation des tests de toxicité (voir figure 4.1). Cette section présente chacune des étapes.

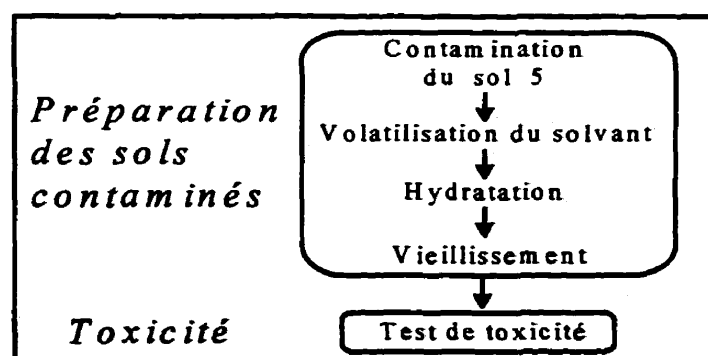


Figure 4.1: Étapes de l'expérimentation pour évaluer la toxicité des HAP

Tel que mentionné précédemment, les HAP utilisés sont le pyrène (P.2146, *Sigma*), l'acénaphthène (pureté: 99 %, *Sigma*), le fluorène (P.6379, *Sigma*) et le phénanthrène (pureté > 96%, *Sigma*).

#### **4.1.2.1 Préparation des sols contaminés**

Cette section présente la démarche standard de préparation des sols en vue de la réalisation des tests de toxicité. Dans certains cas, les manipulations ont été différentes, notamment en ce qui concerne le temps de volatilisation du solvant et l'hydratation du sol. Chaque contamination a été réalisée selon un protocole spécifique résumé à l'annexe E en fonction du test de toxicité (voir section 4.1.2.2).

##### **4.1.2.1.1 Contamination**

Le sol à contaminer était étendu dans un plat en pyrex (19\*30 cm), sur une couche d'environ 1 cm. Une solution mère de contaminant était ensuite préparée en dissolvant le contaminant dans l'acétone (qualité:ACS, *Anachemia*). Le volume requis de solution mère pour atteindre le niveau de concentration désiré était mis dans un bécher de 50 ml avec une seringue de 100  $\mu$ l, 1 ou 5 ml (gas tight, Hamilton), dépendant du volume transféré. Lorsque ce volume était inférieur à 10 ml, un volume d'acétone était ajouté à la solution mère du bécher jusqu'à l'obtention d'un volume total de 10 ml. Ceci permettait de faciliter l'homogénéisation de la contamination. La solution du bécher était ensuite injectée goutte à goutte dans le sol, à l'aide de la même seringue ou une de volume supérieur. À chaque ajout de 3 ml de solution, le sol était mélangé avec une spatule en métal pendant une minute. À la fin de la contamination, le bécher était rincé par 2 ml d'acétone réinjectés dans le sol à l'aide de la/des seringue(s) utilisée(s) précédemment pour limiter les pertes de contaminant par adsorption sur les parois. Cette opération était répétée pour toutes les concentrations prévues au test à effectuer, de la plus faible à la plus élevée.

Dans le cas de contamination par un volume de solution mère supérieur à 25 ml, le volume requis était prélevé à l'aide d'une pipette de verre et directement injecté dans le sol.

#### **4.1.2.1.2 Volatilisation du solvant**

Après la contamination, le plat en pyrex contenant le sol contaminé était laissé sous la hotte pendant 18 heures afin de favoriser la volatilisation du solvant. L'acétone est en effet très volatil (tension de vapeur: 2.36 mmHg à 25°C (Felder et Rousseau, 1986)), 100 fois que l'acénaphthène (tension de vapeur: 2.31 E-02 à 25°C), le HAP le plus volatil. Dans certains cas, cette période de volatilisation a été réduite à 1h30 pour des raisons de logistique ou pour limiter la volatilisation du contaminant. Le sol était alors exposé une heure dans le plat en pyrex, puis mis dans des pots en verre et mélangé pendant une minute. Les pots étaient ensuite entrouverts pendant 30 minutes sous la hotte.

#### **4.1.2.1.3 Hydratation**

Les sols étaient hydratés par de l'eau osmosée selon les prescriptions du protocole de toxicité (voir section 4.1.2.2), puis mélangés avec une spatule. Dans certains cas, l'hydratation a été effectuée avant la contamination pour minimiser la volatilisation.

#### **4.1.2.1.4 Vieillessement de la contamination**

Pignatello et Xing (1995) stipulent que la séparation entre les phases d'adsorption rapide et lente des contaminants organiques a généralement lieu quelques heures ou quelques jours après la contamination. Après l'hydratation, les sols étaient donc soumis à une période de vieillissement pour favoriser la formation d'interactions avec le contaminant. Ils étaient entreposés à l'obscurité ( $21 \pm 2^\circ\text{C}$ ) dans les pots en verre hermétiquement

fermés pendant 8 jours, ce qui permettait l'atteinte de la phase lente d'adsorption tout en limitant les contraintes temporelles.

#### 4.1.2.2 Toxicité

Outre les tests de toxicité utilisant l'orge *H.vulgare* et le ver *E. foetida* détaillés à la section 3.1.5, un test de germination et croissance du cresson *Lepidium sativum* également été réalisé pour le phénanthrène par le laboratoire accrédité *Technitrol-Eco*. Ce test permettait de déterminer si les HAP engendrent le même type de réponse toxique sur deux espèces de plante différentes. Le protocole de cet essai est détaillé à l'annexe D.

Les protocoles expérimentaux (PE) des essais de toxicité effectués sont présentés à l'annexe E. Ces protocoles donnent le détail des conditions de préparation des sols contaminés, et de la réalisation des tests de toxicité (réplicats, concentrations testées).

Le tableau 4.4 résume l'ensemble des tests réalisés sur les 4 HAP à l'étude. Les PE 5C et 6B constituaient des tests préliminaires visant à déterminer le potentiel de toxicité de l'acénaphthène, du fluorène et du pyrène. Le deuxième essai de mortalité du ver avec le fluorène (PE 6F2) a été réalisé dans des conditions différentes de celles des autres tests. Les sols ont été hydratés avant la contamination et l'exposition des vers a été effectuée de façon à minimiser la volatilisation du fluorène.

Les valeurs des  $CL_{50}$  ont été calculées à l'aide du logiciel ICp (Inhibition Concentration approach), une méthode d'interpolation linéaire développée par l'EPA.

**Tableau 4.4: Protocoles expérimentaux des essais de toxicité**

	<b>Germination et croissance de l'orge</b>	<b>Mortalité du ver</b>	<b>Germination et croissance du cresson</b>
Pyrène	5B	6B, 6E	-
Acénaphthène	5C	6B, 6C	-
Fluorène	5C	6B, 6D, 6G	-
Phénanthrène	5E	6F1, 6F2	7

Les essais visant à déterminer la toxicité du solvant ont été réalisés simultanément avec les essais de toxicité des protocoles 5B, 6C et 6D présentés dans le tableau ci-dessus.

### 4.1.3 Évaluation de la volatilité des HAP et du solvant

L'évaluation de la volatilité a été réalisée sur 2 des 4 HAP à l'étude, soit le fluorène et le phénanthrène. Les résultats obtenus pour ces deux composés et une comparaison des tensions de vapeur ont permis de déduire la volatilité du pyrène et de l'acénaphthène. Les manipulations étant différentes dans chaque cas, elles sont présentées séparément. La dernière partie de cette section traite des essais visant à déterminer les quantités d'acétone résiduelle.

Les sols 5 utilisés pour ces analyses ont été hydratés de la même façon que les sols soumis aux essais de mortalité du ver (7,0 ml/100 g de sol sec). Les analyses chimiques des concentrations en HAP ont été réalisées par chromatographie en perméation de gel par le laboratoire accrédité *Maxxam* (voir annexe G).

#### **4.1.3.1 Fluorène**

Deux expériences ont été effectuées afin d'évaluer la volatilité du fluorène dans des conditions expérimentales différentes. Dans la première, 500 g de sol 5 ont été contaminés par 175 mg/kg de fluorène. Après une période de volatilisation de 18 heures, le sol a été mélangé manuellement pendant une minute dans un contenant en verre. Trois échantillons (45 g) ont ensuite été prélevés et hydratés.

Les résultats de l'expérience détaillée au paragraphe précédent ont montré qu'une fraction importante de fluorène s'était volatilisée. Une deuxième expérience a été réalisée en modifiant les conditions de contamination afin de minimiser cette volatilisation et vérifier si cette dernière est similaire dans différents types de sol. En effet, il était appréhendé que le contenu en sable augmente la volatilisation des contaminants. Deux cents grammes des sols 2, 5 et 8, représentant les 3 classes texturales, ont été hydratés (voir annexe F), pesés, puis contaminés par 97 mg/kg de fluorène et homogénéisés à l'aide d'une spatule. Après une période de volatilisation du solvant (1h30), les sols ont été pesés à nouveau et la teneur en eau réajustée. Les échantillons ont été soumis à l'extraction au cours de la même journée que la contamination afin d'éviter que le fluorène n'interagisse avec le sol et qu'une fraction ne soit plus extractible après un certain temps.

#### **4.1.3.2 Phénanthrène**

Deux expériences ont été réalisées afin d'évaluer la volatilité du phénanthrène dans le sol 5. Dans la première, 400 g de sol ont été contaminés par 500 mg/kg de phénanthrène. Après une période de volatilisation (1h30), le sol a été mis dans un pot en verre et mélangé vigoureusement pendant une minute. Trois échantillons de 45 g ont ensuite été prélevés et hydratés.



Les résultats de l'expérience décrite au paragraphe précédent ont montré qu'une fraction importante du phénanthrène n'était plus extractible après la période de volatilisation. Pour expliquer ce constat, une autre expérience a été réalisée afin de vérifier que la période de volatilisation du solvant et la photodégradation n'occasionnaient pas de perte de contaminant, et que la contamination sur sol sec n'augmentait pas le risque d'interactions irréversibles entre le sol et le contaminant. En effet, Karimi-Loftabad *et al.* (1997) ont observé que 20 % du phénanthrène injecté dans un sol sec n'était plus extractible après 4 jours de contact avec le sol.

Deux sols de 300 g ont donc été contaminés par 500 mg/kg de phénanthrène. Le premier avait préalablement été hydraté et le second était sec. Quinze minutes après la contamination, 3 échantillons (réplicats) de 45 g ont été prélevés dans les sols contaminés humides et secs. Le sol sec a alors été séparé en deux parties égales. Une des parties du sol sec et le sol hydraté ont été soumis à la période de volatilisation du solvant (1h30), à l'obscurité sous la hotte. La deuxième partie du sol sec a été exposée sous une hotte éclairée pour vérifier si la dégradation photochimique pouvait induire une perte de phénanthrène. Les deux sols secs (sous la hotte éclairée et sous celle éteinte) ont ensuite été mélangés pendant une minute dans deux pots en verre, puis hydratés. Trois échantillons de 45 g ont été prélevés dans les trois sols. Ces échantillons ont été extraits le lendemain matin pour limiter la formation d'interactions irréversibles.

#### **4.1.3.3 Acétone**

Deux analyses du contenu en acétone dans les sols ont été réalisées simultanément avec les premières analyses chimiques effectuées sur le fluorène et le phénanthrène. Ainsi, les échantillons envoyés au laboratoire d'analyses *Maxxam* ont également été analysés pour leur contenu en acétone par chromatographie capillaire en phase gazeuse. La méthode utilisée est décrite à l'annexe G.

## 4.2 RÉSULTATS ET DISCUSSION

Après un résumé des caractéristiques du solvant, cette section traite des résultats obtenus pour les essais de toxicité et de volatilité effectués sur le pyrène, le phénanthrène, le fluorène et l'acénaphthène. La dernière partie présente un bilan de leurs caractéristiques avant d'établir le choix du contaminant le plus approprié pour l'élaboration d'un modèle prédictif.

### 4.2.1 Caractérisation du solvant

Afin de vérifier l'effet de l'acétone sur les organismes des tests de toxicité, des essais ont été effectués sur le sol 5 avec et sans acétone (voir section 4.1.2.2). Des analyses chimiques ont également été réalisées pour quantifier l'acétone résiduelle dans le sol (voir section 4.1.3.3).

La toxicité du solvant a été évaluée en terme de germination et de croissance de l'orge *H. vulgare*, et de mortalité sur le ver *E. foetida*. Dans le cas de l'orge, les résultats sont présentés au tableau 4.5.

**Tableau 4.5: Germination et croissance ( $\pm$  é.t.) de l'orge *H. vulgare* dans le sol 5 avec et sans acétone (n=3)**

	% de germination		Biomasse individuelle des pousses (mg)	
	sol 5 avec acétone	sol 5 sans acétone	sol 5 avec acétone	sol 5 sans acétone
Essai 1	88 $\pm$ 3	78 $\pm$ 12	10,7 $\pm$ 0.8	12 $\pm$ 2

Une analyse statistique a montré qu'il n'y a pas de différence significative entre les pourcentages de germination et les biomasses individuelles pour les sols avec et sans acétone ( $t_{\text{value}} = 1.47$ , ddl = 4,  $p > 0,05$ ).

Deux tests sur le ver *E. foetida* ont montré que l'acétone résiduelle n'occasionne aucune mortalité. Une analyse de variance a montré que la variation pondérale des vers, présentée au tableau 4.6, est significativement plus élevée dans les sols contenant le solvant ( $F_{1,51} = 8.4$ ,  $p < 0.01$ ). Les témoins des expériences ultérieures devront donc contenir la même quantité d'acétone que les sols contaminés.

**Tableau 4.6: Variation pondérale du ver *E. foetida* dans le sol 5 avec et sans acétone (n=15)**

	% de variation pondérale $\pm$ écart-type	
	sol 5 avec acétone	sol 5 sans acétone
Essai 1	$+ 14 \pm 6$	$+ 9 \pm 5$
Essai 2	$+ 10 \pm 7$	$+ 5 \pm 6$

La section 1.3.3.2 a fait mention que la présence d'un cosolvant dans un sol modifie les propriétés de la matière organique et augmente la solubilité d'un contaminant. Les résultats de deux analyses chimiques, présentés au tableau 4.7, montrent que les quantités résiduelles d'acétone après deux différentes périodes de volatilisation sont très faibles.

**Tableau 4.7: Concentrations résiduelles d'acétone dans le sol 5 (n=3)**

Période de volatilisation	Concentrations résiduelles d'acétone $\pm$ écart-type (mg/kg)
1h30	$< 1$
18 h	$3,5 \pm 0,4$

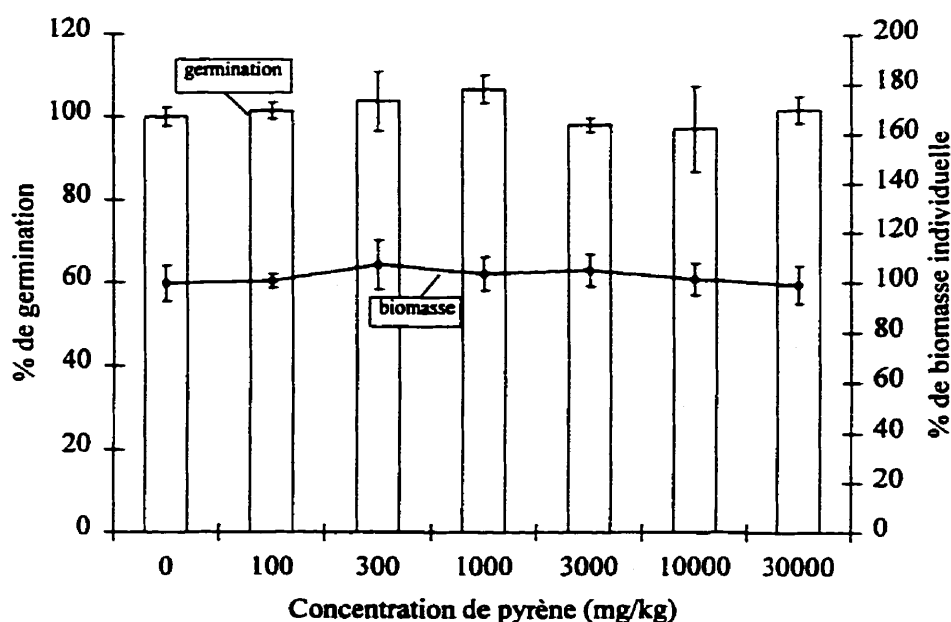
Pour la suite du projet, il est supposé que l'influence du solvant sur la solubilisation des HAP et la structure de la matière organique est négligeable.

## 4.2.2 Toxicité des HAP

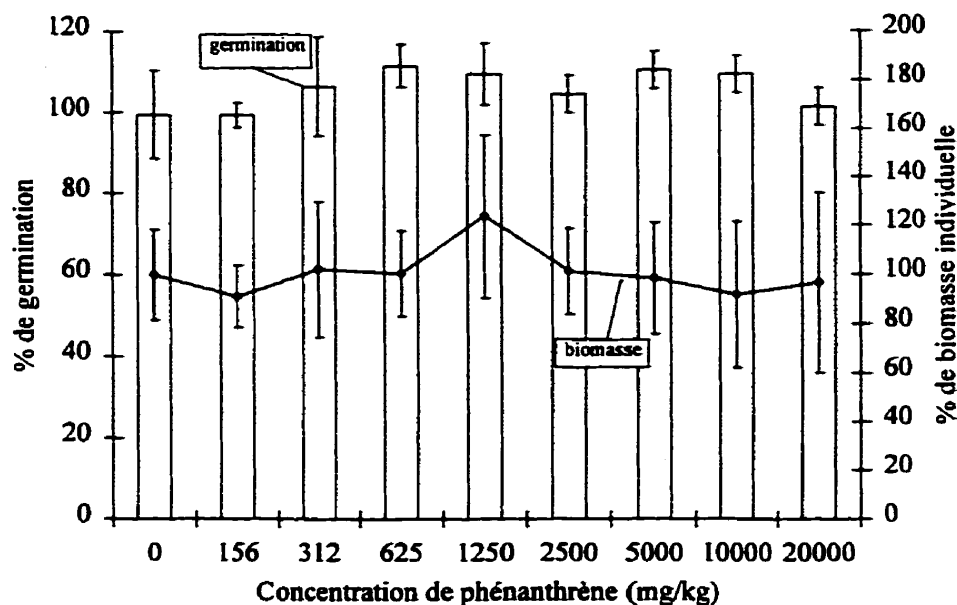
Afin de choisir un contaminant auquel les organismes des tests de toxicité sont sensibles, les effets des 4 HAP sur l'orge (*Hordeum vulgare*), le cresson (*Lepidium sativum*) et le ver (*Eisenia foetida*) ont été mesurés et sont présentés dans cette section. Les résultats sont exprimés en fonction de la concentration de contaminant introduite initialement dans le sol.

### 4.2.2.1 Germination et croissance de l'orge *Hordeum vulgare*

Les figures 4.2 et 4.3 présentent l'effet du phénanthrène et du pyrène sur la germination et la croissance de l'orge *H. vulgare*. À cause du manque de données dans la littérature, l'intervalle de concentrations testées est très élevé, soit de 100 à 30 000 mg/kg pour le pyrène et de 156 à 20 000 mg/kg pour le phénanthrène.



**Figure 4.2: Germination et croissance ( $\pm$  é.t.) de l'orge *H. vulgare* en fonction de la concentration de pyrène dans le sol 5 (n=3).**



**Figure 4.3: Germination et croissance ( $\pm$  é.t.) de l'orge *H. vulgare* en fonction de la concentration de phénanthrène dans le sol 5 (n=3)**

Ces résultats indiquent que le pyrène et le phénanthrène ne sont pas toxiques pour l'orge, malgré l'étendue des concentrations étudiées. Les pourcentages d'inhibition de germination et de croissance sont en effet similaires à ceux observés dans le témoin. De plus, il n'y a pas de différence significative entre les réponses toxiques attribuables à chacune des concentrations de pyrène et de phénanthrène. Des résultats similaires, présentés à l'annexe H, ont été observés dans un test préliminaire visant à déterminer la toxicité du fluorène et de l'acénaphthène pour l'orge. En effet, la germination est élevée pour des sols contaminés par 1000, 5000 et 20 000 mg/kg (supérieure à 83%), et les biomasses individuelles des pousses ne diminuent que légèrement en fonction de la concentration du contaminant.

Les résultats montrent clairement que les **HAP choisis n'affectent pas (ou que très légèrement) les mécanismes de germination et de croissance de l'orge *H. vulgare***. Ce constat pourrait s'expliquer par leur faible solubilité qui limiterait leur biodisponibilité.

En effet, le principal mécanisme de contact des HAP avec les graines d'orge est par assimilation d'eau contaminée à travers les racines. Comme les HAP sont peu solubles, il est possible que la quantité de contaminant biodisponible soit inférieure à celle susceptible d'engendrer un effet toxique mesurable vis-à-vis de l'orge.

Lors du test préliminaire sur l'acénaphthène, le HAP le plus soluble, une observation intéressante a d'ailleurs été faite: il n'y avait aucune croissance racinaire dans l'ensemble des concentrations testées. Il semble donc qu'à partir d'une certaine concentration, les pousses se développent uniquement sur les réserves de la graine.

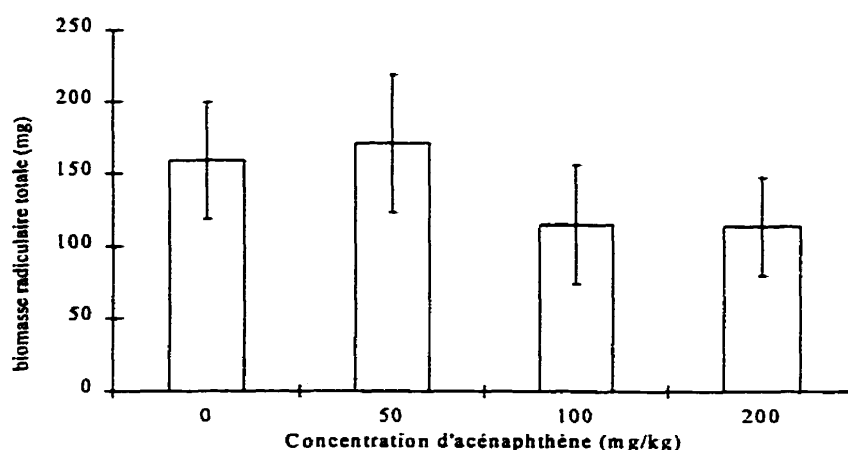
#### **4.2.2.2 Croissance racinaire de l'orge *Hordeum vulgare***

À partir de l'observation effectuée sur l'inhibition de la croissance racinaire de l'orge par l'acénaphthène, la possibilité de développer un test avec la biomasse racinaire de l'orge comme paramètre de mesure a été envisagée. Un tel test, sensible aux contaminants organiques et inorganiques tels que les herbicides, les métaux lourds et le dichlorophénol, a déjà été mis au point sur un milieu rocailleux relativement inerte (Hiley, 1994).

Afin de définir dans quel intervalle il y a inhibition de la croissance racinaire, le sol 5 a été contaminé par 0, 50, 100, 200, 400 et 800 mg/kg d'acénaphthène (PE 5D1). Le test a été débuté de la même façon que celui de germination et croissance des pousses décrit à la section 3.1.5.2. Après 6 jours d'incubation, les racines ont été séparées du sol, puis lavées à grand jet d'eau dans un tamis (9 mesh). Les racines ont ensuite été séchées à 105 °C pendant au moins 16 heures puis pesées pour évaluer leur biomasse.

Visuellement, les racines indiquaient une croissance très différente selon la concentration. Ainsi, elles étaient longues et effilées aux faibles concentrations (0, 50, 100 mg/kg) et trapues à partir de 200 mg/kg. Cette observation avait également été faite par Hiley (1994).

La figure 4.4 présente la biomasse totale des racines de chaque réplicat (40 graines) en fonction des concentrations d'acénaphthène. Les racines des graines exposées à des concentrations de 400 et 800 mg/kg n'ont pas été pesées car leur croissance était similaire à celle des graines exposées à 200 mg/kg. Ces résultats montrent que les poids radiculaires de l'orge à 100 et 200 mg/kg sont similaires. Or, les racines étaient visuellement très différentes pour ces deux concentrations. Les données sont donc biaisées par la présence de particules de sol collées aux racines, même après un lavage vigilant. Cette similitude peut également être attribuée à la forme des racines, car bien que trapues, les racines poussant à 200 mg/kg peuvent avoir un poids semblable aux racines effilées observées à 100 mg/kg.



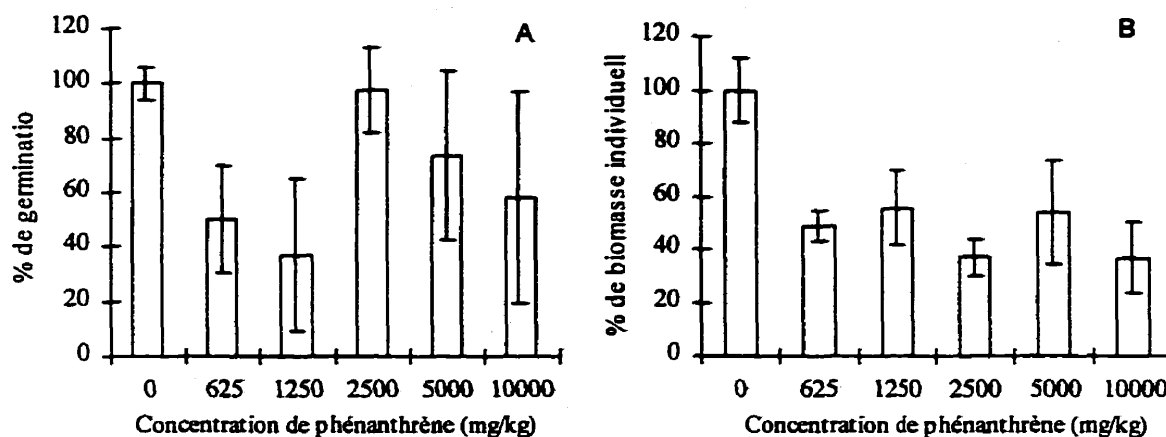
**Figure 4.4: Croissance racinaire ( $\pm$  é.t.) de l'orge *H. vulgare* en fonction de la concentration d'acénaphthène dans le sol 5 (n=3)**

Afin de préciser le domaine de concentration où l'acénaphthène a un effet sur les racines et améliorer la méthode de lavage, un second test a été effectué (PE 5D2). Les sols ont été contaminés par 100, 125, 150, 175 et 200 mg/kg d'acénaphthène. Les résultats obtenus ne peuvent cependant être comparés à ceux du premier essai. En effet, les racines des graines exposées à une concentration de 100 mg/kg de sol sec sont très petites, alors qu'elles étaient longues et effilées lors du premier essai. Le test, en plus d'être difficile d'exécution à cause du lavage des racines, n'est donc pas reproductible. Il a néanmoins permis de montrer que le HAP le plus mobile testé peut induire un effet vis-à-vis de l'orge et que la croissance racinaire de cette plante est un paramètre d'évaluation beaucoup plus sensible que la germination et la croissance des pousses. Cette observation a également été faite pour du seigle et du millet exposés à des sols respectivement contaminés par des métaux (Wong, 1982) et des phénols (Wang, 1985).

#### **4.2.2.3 Germination et croissance du cresson *Lepidium sativum***

Pour vérifier si la faible toxicité des HAP est propre à l'espèce de plante retenue, soit l'orge, un essai de germination et croissance du cresson *L. sativum* a été effectué sur un sol contaminé par du phénanthrène. Pour des raisons financières, seul ce contaminant a été testé. Les résultats obtenus sont présentés à la figure 4.5.





**Figure 4.5: Germination et croissance ( $\pm$  é.t.) du cresson *L. sativum* en fonction de la concentration de phénanthrène dans le sol 5 (n=4). a) germination; b) biomasse individuelle**

Le cresson semble plus sensible que l'orge à la présence de phénanthrène, bien que cette sensibilité soit indépendante de la concentration de contaminant dans le sol. Les réplicats ont de plus présenté des résultats extrêmement variables au sein d'une même concentration, surtout pour la germination. Par exemple, 10 plantes ont été récoltées dans le premier réplicat de sol contaminé par 5000 mg/kg et 3 dans le deuxième réplicat. Santini (1998) avait aussi observé une grande variabilité dans les résultats de germination et de croissance de graines de cresson exposées à des sols contaminés par un mélange de HAP. Quelques raisons pouvant expliquer ce phénomène sont présentées à la section suivante où des résultats très variables ont également été obtenus avec le ver *E. foetida*.

#### 4.2.2.4 Mortalité du ver *Eisenia foetida*

Les réponses toxiques mesurées par la létalité à 7 et 14 jours pour le fluorène et l'acénaphthène sur le ver *E. foetida* sont présentées aux figures 4.6 et 4.7. Les vers semblent très sensibles à ces deux HAP car une faible variation de concentration (40 mg/kg ou moins) engendre des taux de mortalité différents. La variation pondérale des vers exposés à 20, 67, et 96 mg/kg d'acénaphthène montre un gradient en fonction de la concentration pour les sols (voir figure 4.8), une observation qui confirme leur susceptibilité vis-à-vis ce contaminant.

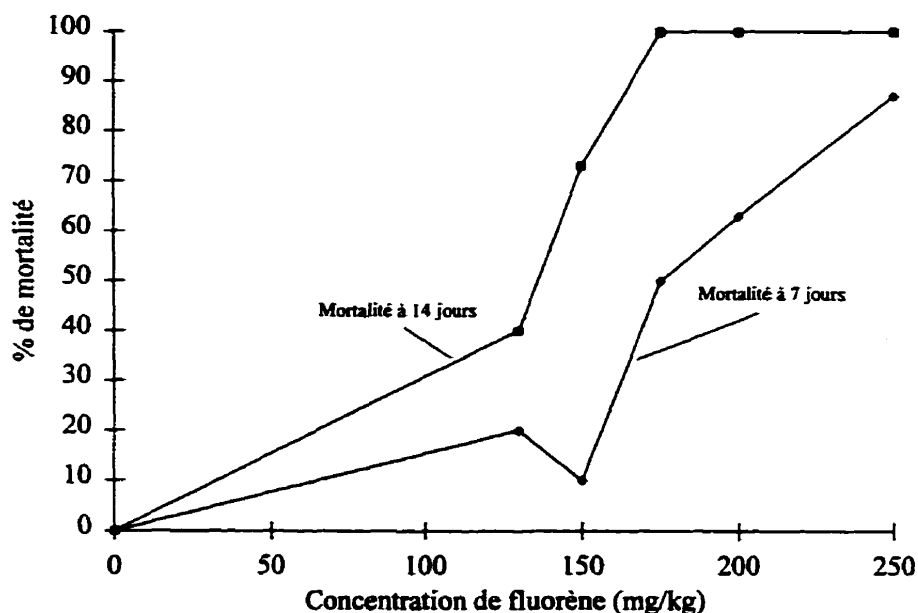
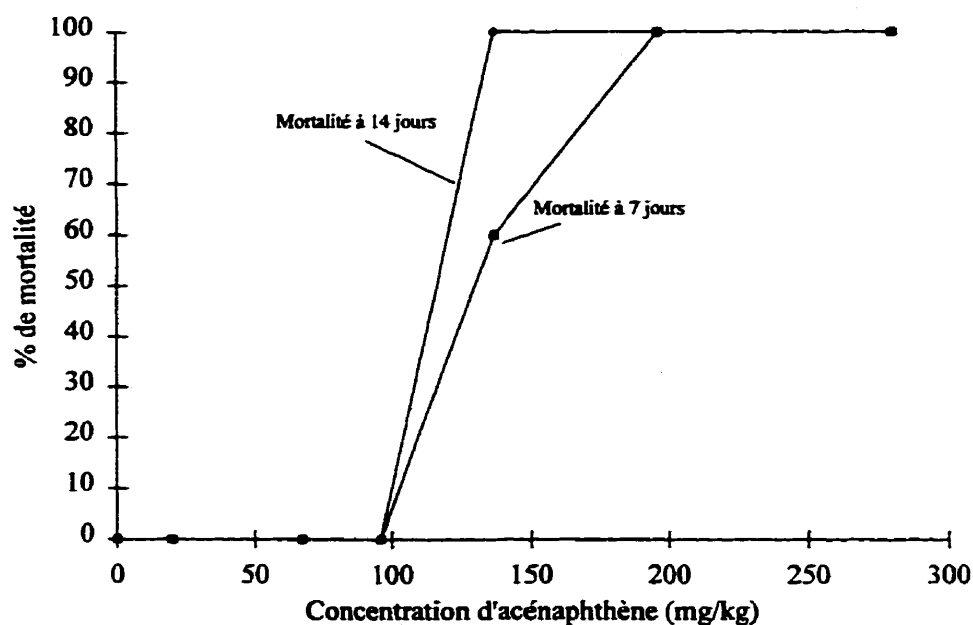
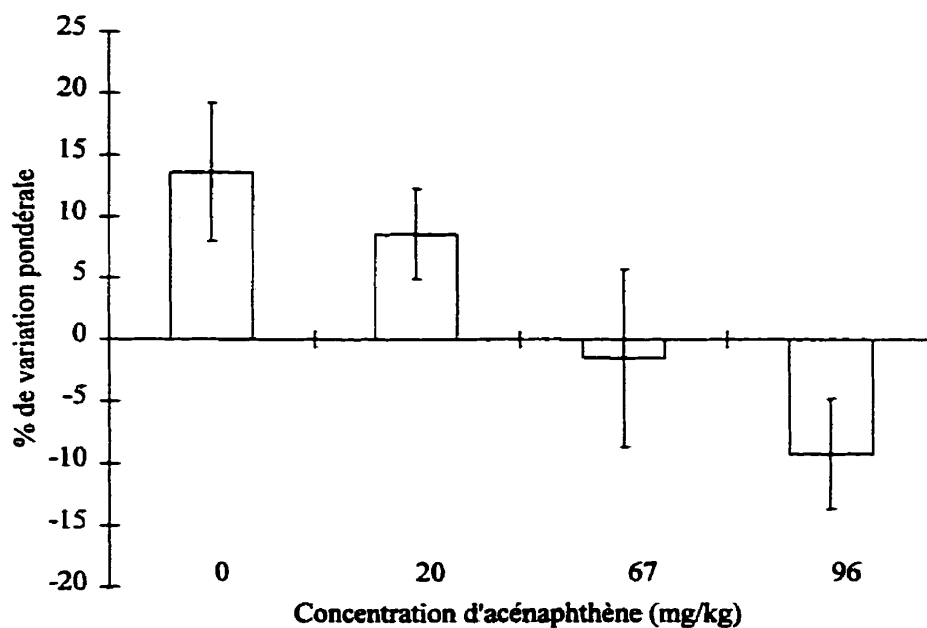


Figure 4.6: Mortalité du ver *E. foetida* à 7 et 14 jours en fonction de la concentration de fluorène dans le sol 5 (n=15).



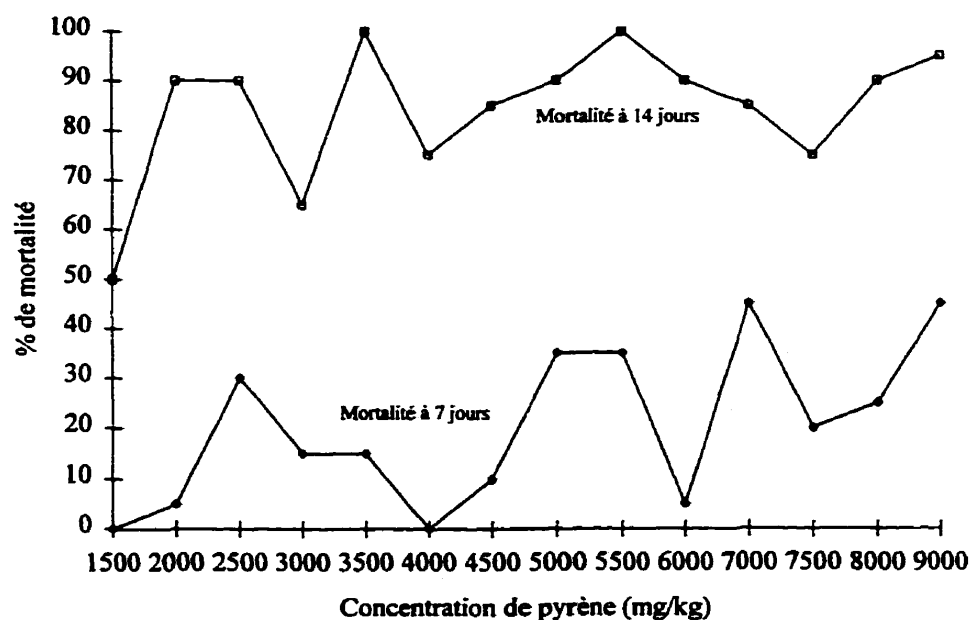
**Figure 4.7: Mortalité du ver *E. foetida* à 7 et 14 jours en fonction de la concentration d'acenaphthène dans le sol 5 (n=15)**



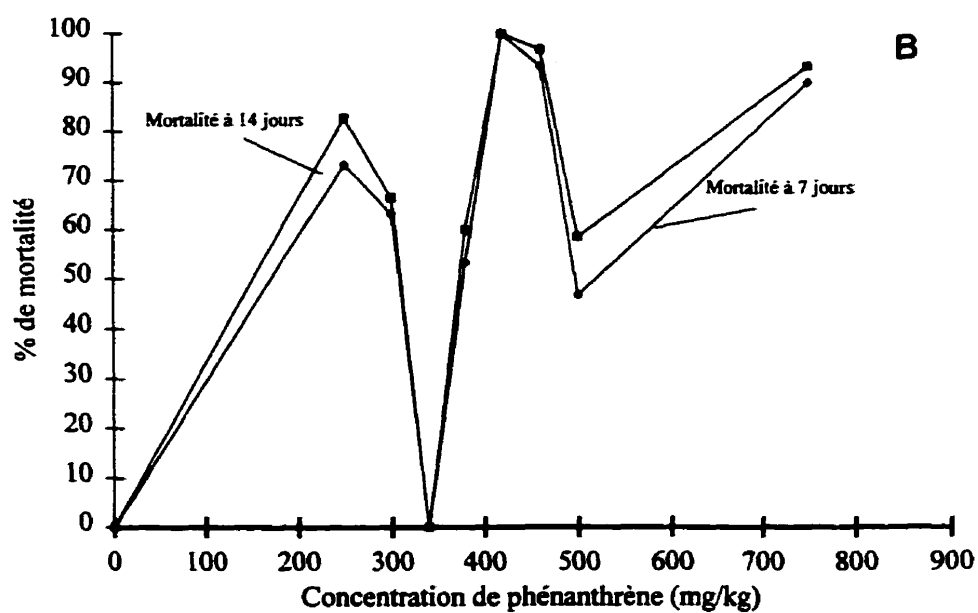
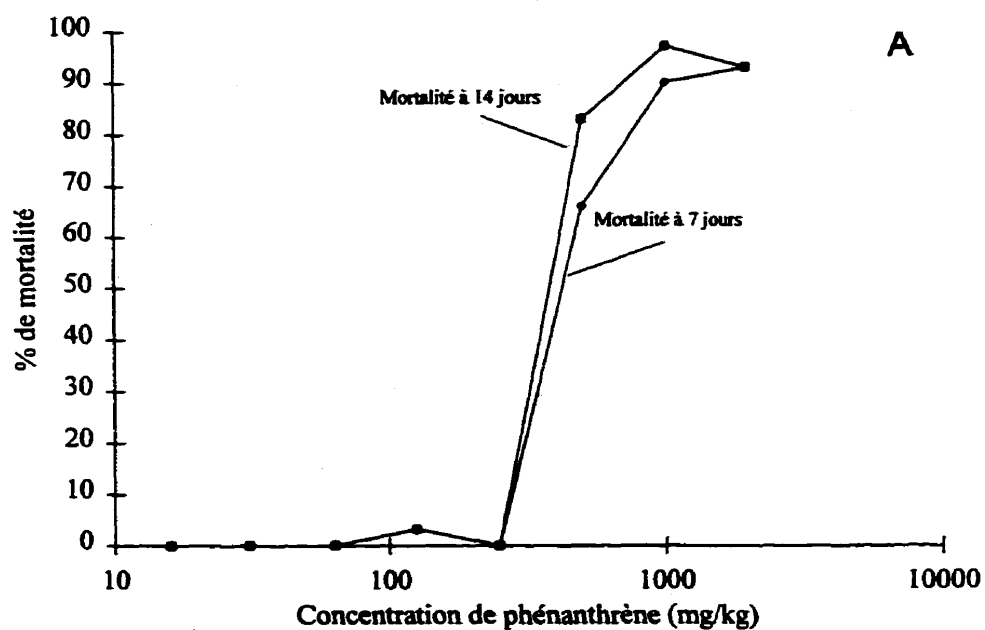
**Figure 4.8: Variation pondérale ( $\pm$  é.t.) du ver *E. foetida* en fonction de la concentration d'acenaphthène dans le sol 5 (n=15)**

La  $CL_{50}$  du fluorène est de 136 mg/kg (é.t.=10) et celle de l'acénaphthène de 116 mg/kg (é.t.=1). La  $CL_{50}$  du fluorène est inférieure à celle retrouvée dans la littérature (173 mg/kg) (Neuhauser *et al.*, 1984), une différence qui peut s'expliquer par le type sol utilisé. En effet, Neuhauser *et al.* (1984) ont obtenu cette valeur dans un sol qui contenait plus de matière organique (10%) et d'argile (20 %) que le sol 5 (2,75 % de matière organique et 16,25 % d'argile), ce qui aurait eu pour effet de diminuer la biodisponibilité du fluorène.

Les résultats de la létalité du ver *E. foetida* engendrée par le pyrène et le phénanthrène sont présentés aux figures 4.9 et 4.10 respectivement. Dans le cas du phénanthrène, deux essais distincts ont été effectués. Comme aucune donnée n'était disponible dans la littérature, le premier visait à déterminer l'ordre de grandeur de la  $CL_{50}$  (figure 4.10a) et le deuxième à en préciser la valeur (figure 4.10b).



**Figure 4.9: Mortalité du ver *E. foetida* à 7 et 14 jours en fonction de la concentration en pyrène dans le sol 5 (n=10)**



**Figure 4.10: Mortalité du ver *E. foetida* à 7 et 14 jours en fonction de la concentration en phénanthrène dans le sol 5 (n=15). a) 1<sup>er</sup> essai b) 2<sup>ème</sup> essai.**

Les résultats obtenus pour ces deux composés sont extrêmement variables et, à partir d'une certaine concentration, les réponses toxiques d'un sol contaminé par du pyrène et du phénanthrène semblent aléatoires. Dans le cas du deuxième essai effectué sur le phénanthrène (figure 4.10b), la perte de poids moyenne des 15 réplicats de vers dans le sol contaminé par 340 mg/kg n'est que de  $6 \pm 5$  %, une indication que les vers n'ont pas été très affectés. Or, la mortalité est de 66,6 % dans le sol contaminé par 300 mg/kg. De plus, ce deuxième essai n'est reproductible au premier (figure 4.10a). En effet, dans le premier essai, il y a 0 % de mortalité à 250 mg/kg et dans le deuxième 82,8 %.

Bien que difficile à interpréter ou justifier, ce genre de réponse est parfois observée avec les essais de toxicité sur matrice solide (Robidoux, 1998). Quelques hypothèses sont généralement avancées pour expliquer cette variabilité, qui a d'ailleurs été notée pour le test de germination et croissance du cresson *L. sativum* dans un sol contaminé par du phénanthrène (figure 4.5).

- Un manque d'homogénéité dans la contamination.
- Une biodisponibilité différente dans chacun des sols causée par le mode de contamination ou par des propriétés adsorbantes dissemblables.
- Une sensibilité individuelle des organismes variable.

Il apparaît difficile d'imaginer que l'une de ces hypothèses puisse s'appliquer. En effet, un manque d'homogénéité ne peut expliquer des variations si marquées dans le cas présent car une attention particulière a été prise pour homogénéiser les sols. D'ailleurs, les résultats des analyses chimiques sur le phénanthrène présentées à la section 4.2.4 confirment que ce facteur n'est pas à l'origine de la variabilité des réponses toxiques. De plus, les sols ayant été contaminés de la même façon et contenant exactement les mêmes proportions de limon, d'argile, de sable et de matière organique, la biodisponibilité devrait être similaire. Même la variabilité individuelle des vers ou des graines de cresson

explique difficilement des réponses si variables puisque ces organismes sont utilisés de façon routinière avec d'autres contaminants organiques sans présenter une telle variabilité. Par ailleurs, la réalisation simultanée d'un test avec des toxiques de référence aurait permis d'éliminer définitivement l'hypothèse de la variabilité des organismes.

La nature du contaminant pourrait expliquer ces résultats. En effet, les organes récepteurs et les mécanismes d'action du contaminant sur le ver sont peut être différents dans le cas d'exposition à des contaminants mobiles (fluorène, acénaphthène) et peu mobiles (phénanthrène, pyrène). Il est également possible que la structure du contaminant influence la toxicité. Le fluorène et l'acénaphthène possédant un cycle benzénique incomplet dans leur structure, leur mécanisme d'action est peut-être différent de celui du pyrène et du phénanthrène qui ont des cycles benzéniques complets. Il est d'ailleurs étonnant qu'aucune donnée de toxicité sur les vers de terre ne soit disponible sur le phénanthrène et le pyrène, deux composés pourtant largement étudiés.

La toxicité des HAP mesurée par la mortalité des vers s'est révélée extrêmement variable selon l'un ou l'autre des composés étudiés. Ainsi, les vers sont peu sensibles aux composés moins mobiles (pyrène, phénanthrène) et cette sensibilité, à partir d'un certain seuil, semble indépendante de la concentration de contaminant dans le sol. Les vers sont cependant très sensibles aux HAP plus mobiles (fluorène, acénaphthène) et les taux de mortalité reproductibles. La sensibilité augmente d'ailleurs avec la diminution de la masse molaire (gradient de sensibilité: pyrène (202.3), phénanthrène (178.4), fluorène (166.2), acénaphthène (154.2)), une observation également faite par Neuhauser *et al.* (1985) (gradient de sensibilité: fluoranthène (202.3), fluorène, acénaphthène). Ceci s'explique en partie par les mécanismes d'ingestion des contaminants par les vers détaillés à la section 1.5.2.3. En effet, le pyrène et le phénanthrène étant peu solubles, il est probable que l'exposition à partir de la solution aqueuse n'est pas très importante.

### 4.2.3 Volatilité des HAP

Afin de vérifier la volatilité des 4 HAP étudiés et l'homogénéité de la contamination, des analyses chimiques ont été effectuées sur des sols contaminés par du fluorène et du phénanthrène. Les résultats obtenus pour ces deux HAP permettaient de déduire la volatilité du pyrène et de l'acénaphthène en comparant les tensions de vapeur des composés. Les résultats obtenus sont présentés dans les sections suivantes.

#### 4.2.3.1 Fluorène et acénaphthène

Les extractions effectuées sur les échantillons contaminés par 175 mg/kg de fluorène (prélevés après la période de volatilisation de l'acétone (18 h)) affichent 39% de perte du contaminant ainsi qu'une importante variabilité entre les 3 réplicats (voir tableau 4.8).

**Tableau 4.8: Concentrations de fluorène dans le sol 5 après une période de volatilisation du solvant de 18 heures**

Réplicat	Valeur cible (mg/kg)	Concentration (mg/kg)	% de perte
1	175	81	54
2	175	130	26
3	175	110	37
<b>Moyenne</b>	-	<b>107</b>	<b>39</b>
<b>Ecart type</b>	-	<b>17</b>	<b>10</b>

L'utilisation d'un composé présentant une telle volatilité est assez risquée, car il est possible qu'elle ne soit pas la même dans tous les types de sol. Étant donné que la tension de vapeur de l'acénaphthène ( $2.23 \text{ E-}02 \text{ mmHg}$ ) est 34 fois plus élevée que celle du fluorène ( $6.67 \text{ E-}04 \text{ mmHg}$ ), il est probable qu'une fraction importante de l'acénaphthène s'est également volatilisée. D'autres conditions de contamination des sols, comme la réduction de la période de volatilisation du solvant et l'hydratation des



sols avant leur contamination, pourraient possiblement minimiser la volatilisation de ces composés.

#### 4.2.3.2 Phénanthrène et pyrène

Tel que décrit à la section 1.1.4.2, deux essais de volatilité ont été réalisés avec le phénanthrène. Les résultats du premier, où la contamination a été effectuée sur un sol sec, sont présentés au tableau 4.9.

**Tableau 4.9: Concentrations du phénanthrène dans le sol 5 après une période de volatilisation du solvant de 1h30**

Réplicat	Valeur cible (mg/kg)	Concentration (mg/kg)	% de perte
1	500	230	54
2	500	260	48
3	500	170	66
<b>Moyenne</b>	-	<b>220</b>	<b>56</b>
<b>Ecart type</b>	-	<b>33</b>	<b>7</b>

En considérant que le phénanthrène a déjà été utilisé sans poser de problèmes de volatilisation (Santini, 1998), la perte importante de phénanthrène ( $56 \pm 7$  %) observée dans cet essai est plutôt surprenante. Elle peut néanmoins être expliquée par l'une des hypothèses présentées ci-dessous:

- Pour faciliter les manipulations et l'homogénéisation, la contamination des sols a été effectuée sur un sol sec (teneur en eau: 0,36%). Or, cette pratique augmente les interactions du sol avec le contaminant, surtout lorsque la masse molaire du contaminant est élevée (Karimi-Loftabad *et al.*, 1996).
- La contamination sur un sol sec peut favoriser la volatilisation du contaminant.

- La période de volatilisation du solvant sous une hotte éclairée peut engendrer de la photodégradation.
- Le délai entre la préparation des échantillons et leur extraction au laboratoire sous-traitant a pu favoriser la formation d'interactions irréversibles entre le sol et le contaminant.

Pour tester ces hypothèses, un plan expérimental, décrit à la section 4.1.4.2, a été élaboré. Les résultats sont présentés au tableau 4.10.

**Tableau 4.10: Concentrations ( $\pm$  é.t.) de phénanthrène dans le sol 5 en fonction de diverses méthodes de contamination (n=3).**

Conditions de contamination	Valeur cible (mg/kg)	Concentration 15 min (mg/kg)	Concentration 1h30 (mg/kg)
sol sec contaminé noirceur	500	610 $\pm$ 72	670 $\pm$ 56
sol sec contaminé lumière	500	610 $\pm$ 72	633 $\pm$ 32
sol hydraté contaminé noirceur	500	513 $\pm$ 230	513 $\pm$ 185

Ces résultats suggèrent que la contamination sur sol sec, la période de volatilisation du solvant et la photodégradation n'engendrent pas de perte de phénanthrène. En effet, il n'y a pas de différence significative entre les extractions effectuées sur sol sec et humide, entre celles effectuées à 15 min et 1h30, et entre celles réalisés sur des sols ayant été soumis à la période de volatilisation avec et sans lumière. Les pertes observées précédemment sont probablement dues à un délai d'analyse qui a augmenté les interactions avec le sol et réduit l'extrahibilité des contaminants. Ce phénomène est peut-être en partie responsable des résultats obtenus pour le fluorène présentés à la section précédente.

Il est cependant important de noter l'importante variabilité des résultats obtenus pour les sols hydratés avant d'être contaminés. Le sol 5 étant assez boueux à l'état hydraté, il était en effet difficile d'y homogénéiser la contamination.

#### 4.2.4 Bilan

Les deux sections précédentes ont détaillé les résultats obtenus de la caractérisation de quatre HAP présentant un potentiel intéressant pour l'élaboration d'un modèle prédictif. Afin de choisir le contaminant le plus approprié, ces résultats sont résumés au tableau 4.11.

**Tableau 4.11: Bilan des caractéristiques des 4 HAP testés**

Contaminant	Réponse toxique		Volatilité
	Ver	Orge	
<b>Pyrène</b>	- Grande variabilité - Essai peu concluant	Non toxique	Faible
<b>Phénanthrène</b>	- Grande variabilité - Non reproductible	Non toxique	Faible
<b>Acénaphthène</b>	- CL <sub>50</sub> : 116 mg/kg - Variations pondérales très sensibles à la concentration	- Non toxique pour la germination et la croissance. - Inhibition de la croissance des racines à 200 mg/kg mais non reproductible.	Élevée
<b>Fluorène</b>	- CL <sub>50</sub> : 136 mg/kg - Vers sensibles	Non toxique	Assez élevée

À cause de sa faible sensibilité vis-à-vis des HAP étudiés, le test utilisant l'orge *H. vulgare* est abandonné. Le test utilisant le cresson *L. sativum* est également rejeté à cause de son importante variabilité. Seul le test de mortalité du ver *E. foetida* est donc retenu pour l'élaboration d'un modèle prédictif.

Les contaminants pouvant être choisis doivent présenter une réponse toxique claire et reproductible, des conditions qui limitent le choix au fluorène ou à l'acénaphthène. Or, les extractions ont montré d'importantes pertes de fluorène (39%) après la période de volatilisation du solvant. L'acénaphthène étant encore plus volatil, il est probable que les pertes soient plus élevées.

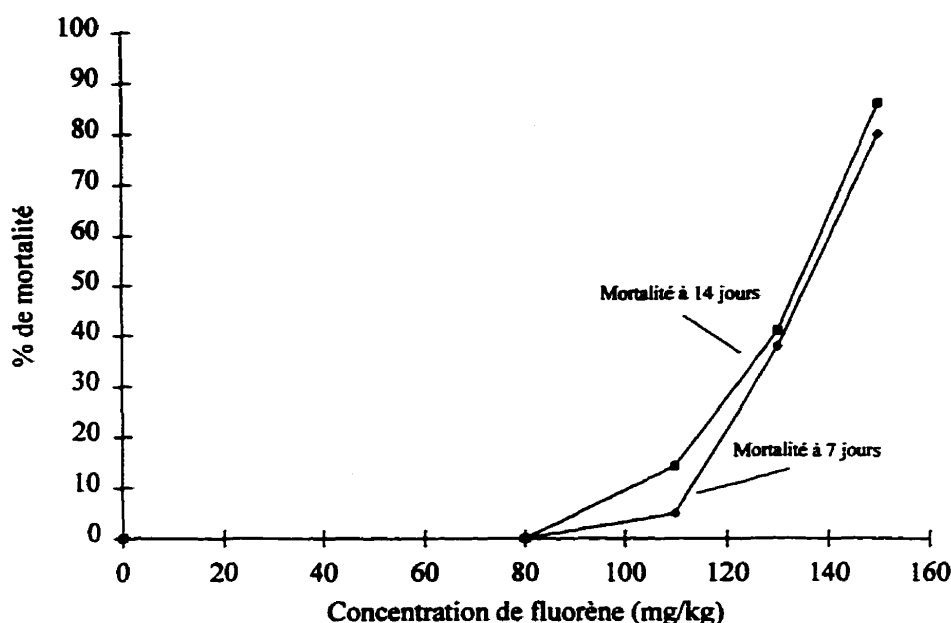
**Le fluorène, malgré sa volatilité, semble donc être le contaminant le plus approprié pour la suite du projet.** Cette possibilité est étudiée dans la section suivante à l'aide d'un nouveau test de mortalité du ver *E. foetida* réalisé en modifiant les conditions expérimentales.

#### **4.2.5 Fluorène: nouvelles conditions**

Afin de déterminer si le fluorène est un composé adéquat pour l'élaboration d'un modèle prédictif, un nouvel essai de toxicité sur le ver *E. foetida* a été réalisé en modifiant les conditions de préparation des sols et de réalisation du test afin de minimiser sa volatilisation (voir PE 6G). Ainsi, les sols ont été hydratés avant la contamination et la période de volatilisation du solvant a été réduite à 1h30. Les contenants dans lesquels s'effectuait la mise en contact du ver avec le contaminant ont également été mis dans des sacs Ziploc pour limiter le transfert du fluorène vers la phase gazeuse. Des analyses chimiques sur les sols 2, 5 et 8 ont permis de vérifier si ces nouvelles conditions minimisent la volatilisation et si cette dernière est similaire dans les 3 classes de sol. Les résultats des tests de toxicité et des analyses chimiques sont présentés dans cette section.

#### 4.2.5.1 Toxicité

Les résultats de létalité du ver *E. foetida* à 7 et 14 jours sont présentés à la figure 4.11. À cause de trous d'aération surdimensionnés, certains vers se sont échappés durant l'expérience. Le nombre de réplicats est donc inférieur à 15 dans plusieurs concentrations, mais demeure supérieur à 70 % du nombre initial.



**Figure 4.11: Mortalité du ver *E. foetida* à 7 et 14 jours en fonction de la concentration en fluorène dans le sol 5: deuxième essai.** (0 mg/kg, n=15; 80 mg/kg, n=12; 110 mg/kg, n=11; 130 mg/kg, n=15; 150 mg/kg, n=15)

Ces résultats confirment que les vers sont très sensibles à la présence de fluorène dans le sol. En effet, une augmentation de la concentration de 130 à 150 mg/kg entraîne une augmentation du taux de mortalité de 45 %. Le tableau 4.12 présente une comparaison des résultats obtenus pour les deux essais de toxicité sur le fluorène dans des conditions de préparation des sols et de réalisation des tests différentes.

**Tableau 4.12: Comparaison de la mortalité du ver *E. foetida* pour les 2 essais sur le fluorène (n=15)**

	Taux de mortalité (%)	
	1 <sup>er</sup> essai (PE 6D)	2 <sup>ème</sup> essai (PE 6G)
130 mg/kg	40	41
150 mg/kg	73	86

Il semble que malgré les précautions prises pour limiter la volatilisation du fluorène, les tests de toxicité donnent des résultats similaires, ce qui en fait un test reproductible. Les  $CL_{50}$  sont de 136 mg/kg (é.t.= 11) pour le premier essai et 134 mg/kg (é.t.= 4) pour celui deuxième essai. Une valeur moyenne de 135 mg/kg de sol sec sera utilisée pour l'élaboration d'un modèle prédictif.

#### 4.2.5.2 Volatilité

Les résultats des analyses chimiques sur les 3 sols contaminés par 97 mg/kg de fluorène (n=3), présentés au tableau 4.13, montrent que la volatilisation n'a pas été plus importante dans le sol sablonneux (sol 2) que dans les sols plus argileux (5 et 8). De plus, une analyse de variance a montré qu'il n'y a pas de différence significative entre chacun des sols ( $F_{2,7} = 1.76$ ,  $p > 0,05$ ). La variabilité des extractions effectuées dans le sol 8 est cependant très importante et il est important de spécifier que les extractions précédant les analyses ne sont réalisées que sur 2 g de l'échantillon testé, ce qui peut avoir pour effet d'accroître la variabilité des mesures. Cette variabilité est probablement beaucoup moins importante dans les 40 g de sol contaminé auquel les vers sont exposés.

**Tableau 4.13: Concentrations de fluorène des 2, 5 et 8 après contamination sur sol hydraté et 1h30 de volatilisation du solvant (n=3)**

	Valeur cible (mg/kg)	Concentration moyenne (mg/kg)	Écart-type (mg/kg)	% de perte
<b>sol 2</b>	97	77	9	20
<b>sol 5</b>	97	62	3	36
<b>sol 8</b>	97	76	22	22

À première vue, la perte moyenne de fluorène dans les 3 sols (26,1%) semble inférieure à celle observée lors de la première expérience (39%) (voir section 4.2.4.1). Il est cependant important de considérer que le test de mortalité du ver a donné des résultats étonnamment similaires, qui laissent supposer que les concentrations de fluorène dans les sols étaient identiques. Les résultats du premier essai d'extraction s'expliquent peut-être par un délai entre la contamination et l'extraction par le laboratoire sous-traitant qui aurait favorisé des interactions entre le contaminant et le sol, comme dans le cas du phénanthrène.

### 4.3 CONCLUSION

L'expérimentation effectuée dans ce chapitre a permis de faire plusieurs observations sur la toxicité des HAP. Ainsi, la germination et la croissance des pousses d'orge *Hordeum vulgare* ne sont pas (ou fort peu) affectées par la présence des 4 HAP testés dans un sol, peu importe la concentration du contaminant. L'acénaphthène, le HAP le plus mobile, a cependant un effet sur la croissance racinaire.

Les travaux réalisés sur le phénanthrène ont montré que ce contaminant affecte la germination et la croissance du cresson *Lepidium sativum*. Les réponses mesurées sont toutefois extrêmement variables au sein de réplicats d'une même concentration, surtout

en ce qui concerne la germination. Des résultats similaires ont été rapportés par Santini (1998) pour des graines de cresson exposées à un sol contaminé par un mélange complexe de HAP.

Il semble donc que l'utilisation de l'orge et du cresson pour évaluer la toxicité des HAP dans les sols soit peu appropriée. Hund et Transpurger (1994) ont par ailleurs observé un effet inhibiteur important d'un mélange de HAP sur la croissance de navets et de pousses de blé, un effet proportionnel à la concentration de contaminant dans le sol. Le choix de l'espèce de plante apparaît donc primordial, car elles présentent des sensibilités très différentes. Il serait intéressant, à l'aide d'un balayage de la toxicité des HAP pour plusieurs espèces de plante, de sélectionner lesquelles pourraient être utilisées spécifiquement pour l'évaluation de la toxicité des HAP dans le sol.

Le ver *Eisenia foetida* semble peu sensible aux composés moins mobiles (pyrène, phénanthrène) mais présente des taux de mortalité sensibles dans le cas d'exposition à des composés plus mobiles (fluorène, acénaphthène). Or, à l'état naturel, les HAP se présentent sous forme de mélanges complexes. Les résultats obtenus dans ce chapitre laissent supposer que la mortalité observée lors de tests sur des contaminations réelles soit uniquement tributaire de quelques HAP du mélange, ou encore, à un effet synergique. Il serait pourtant erroné de conclure que les composés de masse molaire élevée sont moins toxiques pour le ver, car uniquement deux paramètres d'évaluation ont été mesurés avec cet organisme. Il est possible que les HAP de masse molaire élevée induisent des effets chroniques importants, comme la formation d'adduits à l'ADN (Nadeau, 1997). Les HAP contenant plus de 4 cycles benzéniques sont d'ailleurs reconnus pour leurs propriétés cancérigènes (Saucier, 1988).



L'objectif premier de ce chapitre était de trouver un contaminant peu biodégradable et peu volatil, auquel l'orge *H. vulgare* et le ver *E. foetida* sont sensibles et qui engendre des réponses toxiques reproductibles. Comme l'orge n'est sensible à aucun des HAP étudiés, ce test a été abandonné et le modèle prédictif ne reposera que sur la mortalité du ver *E. foetida*.

Le fluorène, malgré sa volatilité, est le contaminant qui respecte le mieux les conditions requises. Les taux de mortalité engendrés chez le ver de terre sont reproductibles et la  $CL_{50}$  est de 135 mg/kg de sol sec ( $n=2$ ,  $\text{é.t.}=4$ ). Des extractions sur 3 sols représentant chacune des classes texturales ont par ailleurs démontré que la volatilisation n'est pas plus importante dans les sols sablonneux, ce qui laisse supposer que la volatilisation d'une partie du fluorène dans chacun des sols n'introduira pas de biais dans les réponses observées. Des essais de biodégradabilité devront cependant être effectués pour compléter la caractérisation du fluorène.

Ce chapitre a également permis de vérifier que le solvant n'est pas toxique et que sa quantité résiduelle dans les sols est minime. Il a permis la mise au point de la méthode de contamination qui sera préconisée pour l'élaboration d'un modèle prédictif. Le contaminant sera injecté dans un sol hydraté et la période de volatilisation du solvant limitée à 1h30.

## **CHAPITRE V**

### **VALIDATION DE LA MÉTHODOLOGIE**

*Les chapitres précédents ont présenté le développement d'une méthodologie visant à modéliser l'influence des caractéristiques pédologiques sur la toxicité d'un contaminant organique non polaire, une méthodologie qui considère les principaux facteurs pouvant influencer la manifestation de cette toxicité.*

*Ce chapitre vise à valider la méthodologie développée, en vérifiant que les différentes quantités de matière organique et d'argile des sols artificiels retenus influencent la toxicité du fluorène vis-à-vis le ver *Eisenia foetida*, et que cette influence est assez marquée pour permettre l'élaboration d'un modèle prédictif. Y sont donc présentés la démarche utilisée pour contaminer 5 différents types de sol ainsi que les résultats obtenus.*

## 5.1 MATÉRIEL ET MÉTHODES

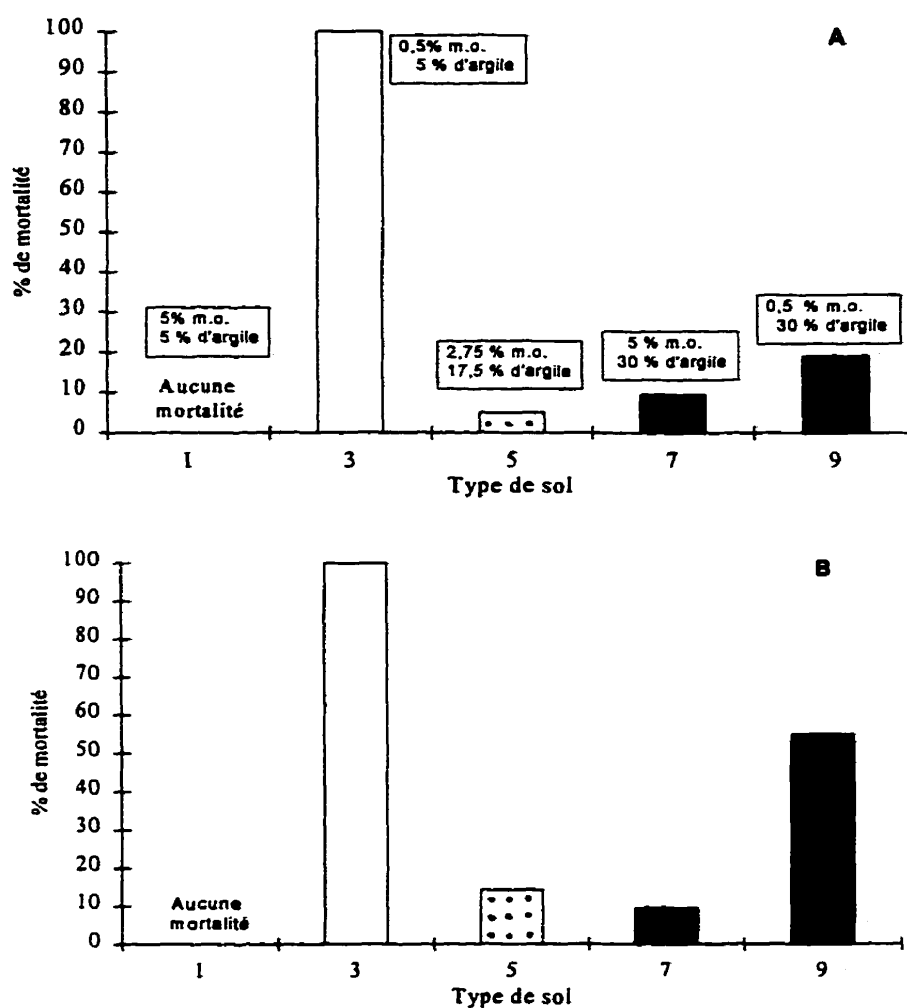
Deux plans expérimentaux ont été proposés à la section 3.2.1: l'un comporte 9 compositions de sol et l'autre 5. Dans les deux cas, les compositions couvrent l'espace expérimental de façon symétrique et uniforme. Pour des raisons logistiques, le modèle à 5 compositions a été retenu pour la réalisation de cet essai préliminaire.

Cette expérience ayant été réalisée simultanément avec la deuxième évaluation de la  $CL_{50}$  du fluorène (section 4.2.8.1), cette dernière (135 mg/kg de sol sec) n'a pu être utilisée. Les sols 1, 3, 5, 7 et 9, préalablement hydratés (voir annexe F), ont donc été contaminés par 110 mg/kg de fluorène, une concentration susceptible d'engendrer des effets sur les organismes exposés. Après des périodes de volatilisation (1h30) et de vieillissement (8 jours), l'essai de mortalité du ver a été débuté.

Les conditions de réalisation du test sont identiques à celles du protocole 6F2. Pour minimiser la volatilisation, les 15 réplicats de chaque type de sol ont été mis dans un sac de plastique (Ziploc) entrouvert pour assurer un renouvellement minimal de l'oxygène dans l'enceinte. Afin d'éviter que le fluorène ne contamine l'incubateur habituellement utilisé pour les essais, ces sacs ont été placés sous une hotte chimique. La température a été mesurée par un thermomètre installé sous la hotte et s'est maintenue à 22 °C tout au long de l'essai. La photopériode de 16 heures était assurée par une lampe munie d'un minuteur.

## 5.2 RÉSULTATS ET DISCUSSION

La figure 5.1 présente la mortalité du ver *Eisenia foetida* exposés à 110 mg/kg de fluorène dans les 5 différents types de sol. En raison du surdimensionnement des trous d'aération pratiqués sur le couvercle des contenants d'essai, plusieurs vers se sont échappés, diminuant ainsi le nombre de répliquats de la plupart des sols. Le nombre total de vers dans chaque sol demeure cependant supérieur à 70 % du nombre initial.



**Figure 5.1: Mortalité du ver *E. foetida* à 7 et 14 jours dans les sols 1, 3, 5, 7 et 9 contaminés par 110 mg/kg de fluorène. a) 7 jours; b) 14 jours; sol 1, n=12; sol 2, n=15; sol 5 et 7, n=11; sol 9, n=14.**

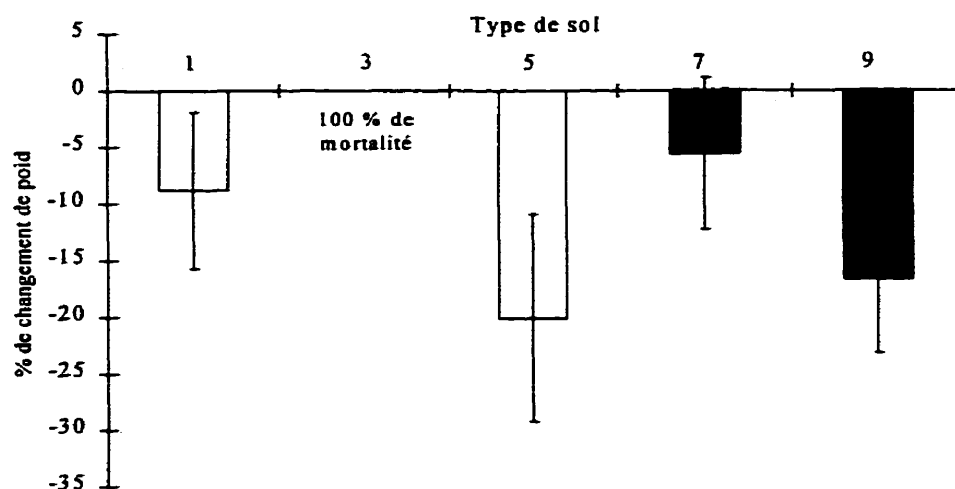
Les résultats de mortalité des vers à 7 jours mettent en évidence l'importante toxicité du sol contenant peu de matière organique (0.5 %) et d'argile (5 %) (sol 3), où la létalité s'est manifestée pour l'ensemble des vers exposés à l'intérieur d'un délai de 7 jours. L'observation visuelle de l'état de décomposition des vers a permis de conclure que la mortalité s'est probablement produite dans les premiers jours de l'exposition.

La mortalité à 14 jours montre **l'influence majeure de la matière organique sur la toxicité du fluorène**. En effet, malgré la faible quantité d'argile qu'il contient, le sol 1 n'occasionne aucune mortalité. Cette absence de mortalité est probablement due à son important contenu en matière organique (5 %).

Le sol 5 affiche une mortalité plutôt faible (14,3 %) qu'il est difficile de comparer, car c'est le seul sol possédant 2,75 % de matière organique et 16,5 % d'argile. Cependant, si on compare ce résultat avec celui obtenu pour le sol 9 (qui contient pourtant plus d'argile), il semble que la différence de matière organique (2,25 %) ait un effet bénéfique pour les vers. Les variations pondérales présentées à la figure 5.2 montrent toutefois une importante perte de poids des vers exposés à ce sol ( $20 \pm 9$  %).

Le sol 7 contenant les quantités maximales d'argile et de matière organique, la toxicité y est très faible (seuls 2 vers sur 22 sont morts). La perte de poids est d'ailleurs peu importante ( $6 \pm 7$  %), une indication que les vers ne subissent pas d'effets sublétaux significatifs.

Enfin, le sol 9 présente une mortalité à 14 jours de 55 %. En comparant ce pourcentage à celui du sol 3 (100%), il semble que **le contenu d'argile d'un sol diminue le potentiel toxique du fluorène de façon importante**.



**Figure 5.2: Variation pondérale ( $\pm$  é.t.) à 14 jours du ver *E. foetida* dans les sols 1, 3, 5, 7 et 9. Sol 1, n=11; sol 3, n=0; sol 7, n=7; sol 9, n=5.**

Les réponses toxiques obtenues dans cette expérience visant à valider le choix des sols et du contaminant sont très marquées, et suggèrent qu'un modèle prédictif de la toxicité en fonction de la composition du sol est réalisable. Ce dernier, à l'aide d'une analyse de régression multiple, permettrait d'une part de prédire la réponse pour n'importe quelle composition de mélange située à l'intérieur de l'espace expérimental défini à la section 3.1.1.3 et, d'autre part, d'obtenir des mesures de l'influence de chaque composant seul ou en combinaison avec d'autres. Dans le cadre du projet, où l'influence de la quantité de sable, d'argile et de matière organique est étudiée, trois types de modèles (ou d'équations) pourraient être obtenus.

1<sup>er</sup> ordre:

$$\text{réponse toxique} = \beta_s x_s + \beta_a x_a + \beta_m x_m$$

2<sup>ième</sup> ordre:

$$\text{réponse toxique} = \beta_s x_s + \beta_a x_a + \beta_m x_m + \beta_{sa} x_s x_a + \beta_{sm} x_s x_m + \beta_{am} x_a x_m$$

3<sup>ième</sup> ordre:

$$\text{réponse toxique} = \beta_s x_s + \beta_a x_a + \beta_m x_m + \beta_{sa} x_s x_a + \beta_{sm} x_s x_m + \beta_{am} x_a x_m + \beta_{sam} x_s x_a x_m$$

Les variables  $x_s$ ,  $x_a$  et  $x_m$  représentent les proportions de chaque composant à l'étude et l'évaluation de la toxicité engendrée par 135 mg/kg de fluorène dans les 9 types de sol permettrait de déterminer la valeur des coefficients  $\beta$ . L'exactitude de ces modèles et le choix du plus approprié seraient déterminés à l'aide d'une analyse de variance.

### 5.3 CONCLUSION

Les résultats de cette expérience préliminaire suggèrent que l'argile et la matière organique ont une influence importante sur la toxicité létale du fluorène. Ainsi, malgré leur concentration de fluorène identique (110 mg/kg), un sol qui contient 5 % de matière organique ne provoque aucune mortalité après 14 jours alors qu'un autre de texture similaire contenant 0.5 % de matière organique provoque une mortalité complète des organismes exposés en quelques jours. La littérature ne rapporte aucun cas ou des différences si marquées ont été observées.

Ces résultats démontrent bien que les 9 types de sol choisis présentent des propriétés adsorbantes très différentes, qui modifient grandement la biodisponibilité du fluorène. Ce dernier s'avère d'ailleurs, à cause de la grande sensibilité des vers qui y sont exposés, un excellent contaminant pour l'élaboration d'un modèle. De plus, les différences marquées entre les diverses réponses toxiques laissent supposer que la réalisation de ce modèle de prédiction des réponses toxiques en fonction de la composition du sol est réalisable.

## CONCLUSION GÉNÉRALE

La validation des critères génériques et l'utilisation de la nouvelle approche de gestion des sols, l'analyse de risque, nécessitent la compréhension de nombreux mécanismes qui peuvent influencer les effets toxiques des contaminants. Afin d'améliorer cette compréhension, ce projet a permis de développer une méthodologie apte à modéliser la réponse toxique d'un HAP en fonction du contenu en argile et en matière organique d'un sol.

Pour ce faire, neuf sols artificiels, dont la composition a été déterminée à l'aide d'un algorithme spécifique aux modèles statistiques impliquant des mélanges, ont été préparés et caractérisés. Des essais de toxicité et de volatilité sur 4 HAP (pyrène, fluorène, acénaphthène, phénanthrène) ont permis de sélectionner le fluorène et l'essai de mortalité du ver *E. foetida* pour l'élaboration d'un modèle prédictif. Une expérience visant à valider la méthodologie développée a permis d'observer des différences de toxicité très marquées selon le contenu en matière organique et en argile des divers types de sol. De tels effets n'ont jamais été rapportés dans la littérature.

La méthodologie développée possède donc un excellent potentiel pour l'élaboration d'un modèle prédictif de la toxicité d'un contaminant organique non polaire. De plus, étant donné les différences marquées dans les réponses toxiques observées, il apparaît imminent de considérer l'influence des caractéristiques pédologiques lors de la validation des critères génériques et la réalisation des analyses de risque écotoxicologique. L'exactitude des conclusions en dépend.

Les tendances mises en évidence par ce modèle pourraient également être adaptées à d'autres contaminants non polaires. De plus, le plan expérimental et les sols préparés peuvent être utilisés pour l'étude des phénomènes d'adsorption lente (aging) dans divers



types de sol ou encore de l'influence des paramètres pédologiques sur la toxicité de d'autres types de contaminants (métaux, contaminants polaires). Le plan expérimental sera d'ailleurs prochainement utilisé dans une étude sur la toxicité de différents sols contaminés par un mélange d'arsenic, de chrome et de cuivre spécifiquement formulé pour le traitement antifongique du bois. Les possibilités offertes par la méthodologie développée dans ce projet sont donc multiples et permettront sans doute d'améliorer les connaissances sur l'influence des caractéristiques du sol sur la toxicité des contaminants.

## RECOMMANDATIONS GÉNÉRALES

La méthodologie nécessaire pour effectuer le modèle prédictif de la toxicité du fluorène en fonction des divers types de sol pourra se traduire par les quatre étapes présentées ci-dessous.

### 1. Raffinement de la caractérisation du fluorène

Afin de mieux connaître le devenir du fluorène dans le sol, les essais suivants devront être effectués:

- Deux essais de mortalité du ver pour valider la  $CL_{50}$  obtenue (135 mg/kg) et mieux définir l'écart-type qui lui est associé.
- Déterminer la quantité d'acétone résiduelle dans un sol hydraté avant la contamination.
- Effectuer une extraction chimique sur divers types de sol pour confirmer que la volatilisation n'est pas plus importante dans certains types de sol.
- Valider l'absence de biodégradabilité du fluorène sur une période de 22 jours.

### 2. Tests de toxicité sur les 9 types de sol

Il est recommandé que trois réplicats de sols contaminés et trois témoins soient testés pour chaque type de sol. Les réplicats pourraient être séparés dans le temps, c'est-à-dire qu'au temps 1, les 9 compositions de sol seraient testées avec leurs témoins respectifs. Au temps 2, la toxicité d'une nouvelle préparation des compositions de sol serait évaluée.

Des essais de toxicité sur des toxiques de référence seront réalisés parallèlement aux essais visant l'élaboration du modèle, afin de vérifier que la sensibilité des vers n'introduit pas un biais dans les réponses observées. Des analyses chimiques permettront

également de déterminer la concentration de fluorène dans les sols au début des tests de toxicité.

### **3. Élaboration et validation du modèle prédictif**

Étant donné les différences de toxicité très marquées observées lors de l'essai de validation de la méthodologie, il serait important que ce modèle tienne compte de l'évolution des réponses toxiques dans le temps.

Le modèle créé à l'aide du logiciel STATISTICA pourrait également être validé par des essais sur compositions autres que les 9 sols préalablement définis.

### **4. Détermination du coefficient de distribution dans chacun des sols**

La connaissance des coefficients de distribution ( $K_d$ ) permettra de déterminer si les réponses toxiques peuvent être extrapolées à partir de la concentration de contaminant présente dans la phase aqueuse.

### **5. Améliorations possibles**

La revue de littérature a mis en évidence que la composition chimique de l'argile a un effet sur l'adsorption des contaminants non polaires. Or, l'argile utilisée dans le projet possède des charges variables, peu représentatives des argiles des régions tempérées. Préparer les sols avec une argile chargée négativement pourrait s'avérer une avenue de recherche intéressante.

## RÉFÉRENCES

ALEXANDER, M. (1995). How toxic are toxic chemicals in soil? Environmental Science and Technology, **29**, 2713-2717.

ALLOWAY, B.J. et AYRES, D.C. (1993). Chemical Principles of Environmental Pollution, Blackie Academic & Professional, Glasgow, 291 p.

ASTDR. (1990). Public health statement: Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, <http://astdr1.astdr.cdc.gov:8080/Toxprofile>.

BABICH, H. et STOTSZKY, G. (1983). Environmental factors affecting the utility of microbial assays for the toxicity and mutagenicity of chemical pollutants. Toxicity Testing Using Microorganisms, B.J. Dutka, G. Bitton, Boca Raton, FL, 9-42.

BACKUS, D.H. (1990). Colloids in groundwater: laboratory and field studies of their influence on hydrophobic organic contaminants, Thèse de doctorat, Massachusetts Institute of Technology, USA.

BALL, P.B. (1991). Long-term sorption of halogenated organic chemicals by aquifer material. 2. Intraparticule diffusion. Environmental and Science Technology, **25**, 1237-1249.

BALL, W. et ROBERTS, P.V. (1991). Long term sorption of halogenated organic chemicals by aquifer material. 1. Equilibrium. Environmental Science and Technology, **25**, 1223-1236.

BASTIEN, J. (1997). Technicien en chimie minérale, Chaire de géophysique de l'École Polytechnique de Montréal, conversation personnelle.

BECKER, H. (1992). Introduction. Ecotoxicology of Earthworms, P.W. Greig -Smith, H. Becker, P.J. Edwards, P. Heimbach, Intercept Ltd., UK, 1-3.

BEYER, W.N., MOMENT, G. et CROMARTIE, E.J. (1985). Accumulation of methylmercury in the earthworm *Eisenia foetida*, and its effect on regeneration. Bulletin of Environmental toxicology, **35**, 157-162.

BLOOM, P.R. (1997). Department of soil, water and climate, University of Minnesota, communication personnelle.

BOAKAI, K. R. et ALEXANDER, M. (1998). Sequestration of DDT and dieldrin in soil: disappearance of acute toxicity but not the compounds. Environmental Toxicology Chemistry, **17**, 1034-1038.

BOESTEN, G.J.T.I. (1990). Influence of solid/liquid ratios on the experimental error of sorption coefficients in pesticide/soil system. Pesticide Science, **30**, 31-41.

BOSMA, T.M.P, MIDDELDORP P.J.M, SCHRAA, G. et ZEHNDER, A.J.B. (1997). Mass transfer limitation of biotransformation: quantifying bioavailability. Environmental Science and Technology, **31**, 248-252.

BOUCHÉ, M.B. (1992). Earthworm species and ecotoxicological studies. Ecotoxicology of Earthworms, H. B. P.W. Greig -Smith, P.J. Edwards, P. Heimbach, Intercept Ltd, UK, 20-35.

BOWER, C.A. et GSCHWEND, F.B. (1952). Ethylene glycol retention as a mesure of surface area and interlayer swelling. Soil Science Society of America Proceedings, **47**, 342-345.

BRUNAUER, S., EMMETT, PH. ET TELLER, E. (1938). Adsorption of gases in multimolecular layers. Journal of American Chemical Society, **60**, 309-318.

BRUSSEAU, M.L. (1991). Influence of organic cosolvents on the sorption kinetics of hydrophobic organic chemicals. Environmental Science and Technology, **25**, 903-910.

BUREAU, J. (1998). Écotoxicologue, Biopro, École Polytechnique de Montréal, conversation personnelle.

BURTON, G.A. (1990). Ecotoxicology- The study of the effect of chemicals on natural systems. Environmental Science and Technology, **24**, 9.

CALLAHAN, C.A., SHIRAZI, M.A. et NEUHAUSER, E.F. (1994). Comparative toxicity of chemicals to earthworms. Environmental Toxicology and Chemistry, **13**, 291-298.

CERNIGLIA, C.E. (1993). Biodegradation of polycyclic hydrocarbons. Environmental Biotechnology, **4**, 331-338.

CHASSE, R. (1997). Écotoxicologue, Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec, MEF, conversation personnelle.

CHIOU, C.T. (1989). Theoretical considerations of the partition uptake of nonionic compounds by soil organic matter. Reactions and Movement of Organic Chemicals in Soil, B.L. Sawhney, K. Brown, Soil Science Society of America, Wisconsin, 1-29.

CHIOU, C.T. (1990). The surface area of soil organic matter. Environmental Science and Technology, **24**, 1164-1166.

CHIOU, C.T. et KILE, D.E. (1994). Effects of polar and nonpolar groups on the solubility of organic compounds in soil organic matter. Environmental Science and Technology, **28**, 1139-1144.

CHIOU, C.T. , MCGRODDY, S.E. et KILE, D.E. (1998). Partition characteristics of polycyclic aromatic hydrocarbons on soil and sediments. Environmental Science and Technology, **32**, 264-269.

CHUNG, N. et ALEXANDER, M. (1998). Differences in sequestration and bioavailability of organic compounds aged in dissimilar soils. Environmental Science and Technology, **32**, 855-860.

CNRC. (1985). Les hydrocarbures aromatiques polycycliques dans le milieu aquatique: formation, source, devenir et effets sur le biote aquatique, n°18 982.

COMEAU, Y. (1997). CIV6216 Biorestauration des sols contaminés. École Polytechnique de Montréal.

CORNELISSEN, G., VAN NOORT, P.C.M., PARSONS, J.R. et GOVERS, H.A.J. (1997). Temperature dependance of slow adsorption and desorption kinetics of organic compounds in sediments. Environmental Science and Technology, **31**, 454-460.

CORNELL, J.A. (1983). How to run mixture experiments for product quality. S.S. Shapiro, J.A. Cornell, The ASQC Basic References in Quality Control: Statistical Techniques Wisconsin, 5, 60 p.

DESCHENES, L. (1995). Impact des surfactants biologiques et du SDS sur la mobilisation et la biodégradation des HAP contenus dans un sol contaminé à la créosote, Thèse de doctorat, INRS-Eau, Canada.

DUCHAUFOR, P. (1965). Précis de pédologie. Masson et Cie, Paris, 481 p.

EDWARDS, P.J. et COULSON J.M. (1992). Choice of earthworm species for laboratory species. Ecotoxicology of Earthworms, P.W. Greig-Smith, H. Becker, P.J. Edwards, P. Heimbach, Intercept Ltd, UK, 36-43.

EDWARDS, C.A. (1992). Testing the Effects of chemicals on earthworms: the advantages and limitations of field tests. Ecotoxicology of Earthworm, P.W. Greig-Smith, H. Becker, P.J. Edwards, P. Heimbach, Andover, UK, 75-83.

ENVIRONNEMENT Canada. (1979). Analytical Manual, Nadaquat 80050.

ENVIRONNEMENT CANADA, RINGUETTE, S. (1993a). Présence des HAP dans l'environnement canadien: portrait de la situation. Liste des substances d'intérêt prioritaire: document de support n°2.

ENVIRONNEMENT CANADA, FABRI-FORGET, M. (1993b). Rejets de HAP à l'environnement au Canada-1990. Liste des substances d'intérêt prioritaire: document de support n°1.

ENVIRONNEMENT CANADA, GERMAIN, A., PERRON, F. et VAN COILLIE, R. (1993c). Cheminements, écotoxicités et réglementations pour les HAP dans l'environnement. Liste des substances d'intérêt prioritaire: document de support n°3 102 p.

ENVIRONNEMENT, CANADA. (1994). Hydrocarbures aromatiques polycycliques. Liste des substances d'intérêt prioritaire: rapport d'évaluation, CA1 EP8.

EPA, KOLLIG, H.P., HAMRICK, K.J. ET KITCHENS, B.E. (1991). FATE, the environmental fate constants information system database, EPA/600/S3-91/045, Environmental research laboratory.

EPA. (1998). EPA Series SW-846 Methods: 8270D Semivolatil organic compounds by gas chromatography/mass spectrophotometry (GC/MS).

EVERETT, D.H., POWL, J.C.J. (1976). Adsorption in slit-like and cylindrical micropores in the Henry's law region. Chemical Society, 72, 619.

FALL, C. (1995). Équilibre et cinétique de sorption du PCP et du phénanthrène dans les sols contaminés, Thèse de doctorat, École Polytechnique de Montréal, Canada.

FARELL, J. et REINHARD, M. (1994). Desorption of halogenated organics from model solids, sediments, and soil under unsaturated conditions. 1 Isotherms. Environmental Science and Technology, 28, 53-62.

FELDER, R.M. et ROUSSEAU., R.W. (1986) Elementary principles of chemical processes, John Willey & Sons, 668 p.

FLETCHER, J. (1991). Keynote speech: a brief overview of plant toxicity testing. Plants for Toxicity Assessment, W. Gorsuch, W.R. Lower, W.Wang, M.A. Lewis, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, 5-11.

FORBES, V.E. et FORBES T.L. (1994). Ecotoxicology in Theory and Practice, Chapman et Hall, London, 247 p.

FOTH, H.D. (1990). Fundamentals of Soil Science, ed. Wiley, NY, 360 p.

GAUTHIER, T.D., SELTZ, W.R. et GRANT, C.L. (1987). Effects of structural and compositional variations of dissolved humic materials on pyrene Koc values. Environmental Science and Technology, 21, 243-248.

GEERDINK, M. J., VAN LOOSDRECHT, M. et LUYBEN, K.C.A.M. (1996). Model for microbial degradation of nonpolar organic contaminants in a soil slurry reactor. Environmental Science and Technology, 30, 779-786.

GREENE, J.C., BARTEL, C.L., WARREN-HICKS, W.J., PARKHURST, B.R., LINDER G.L., PETERSON, S.A. et MILLER, W.L. (1989). Protocols for short term toxicity of hazardous waste sites, EPA 600/3-88/029, US Environmental Protection Agency.

GUNTHER, P. et PESTEMER, W. (1990). Risk assessment for selected xenobiotics by bioassay methods with higher plants. Environmental Management, 14, 381-388.

HATZINGER, P.B. et ALEXANDER, M. (1995). Effect of aging of chemicals on their biodegradability and extrability. Environmental Science and Technology, 29, 537-545.

HILEY, P.D. (1994). The use of barley root elongation in the toxicity testing of sediments, sludges, and sewages. Ecotoxicology of Soil Organisms, M. H. Donker, H. Eijsackers, F. Heimbach, Boca Raton, FL, 191-198.

HUANG, W., SCHLAUTMAN, M.A. et WEBER, W.J. (1996). A distributed reactivity model for sorption by soils and sediments. 5. The influence of near-surface characteristics in mineral domains. Environmental Science and Technology, 30, 2993-3000.

HUCKABEE, J.W. (1985). Evaluation of tests to predict chemical injury to ecosystems: Microcosms. Methods for Estimating Risk of Chemical Injury: Human and Non-Human Biota and Ecosystems, V.B. Vouk, G.C. Butler, D.G. Hoel, D.B. Peakall, Scope.

HUND, K. et TRAUNSPURGER, W. (1994). Ecotox. Evaluation strategy for soil bioremediation exemplified for a PAH-contaminated site. Chemosphere, 29, 371-390.



JOERN, A. et HOAGLAND, K.D. (1996). In defense of whole-community bioassays for risk assessment. Environmental Toxicology and Chemistry, **15**, 407-409.

KARIKHOFF, S.W. (1981). Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils. Chemosphere, **10**, 833-846.

KARIMI-LOFTABAD, B., PICKARD, M. A. et GRAY, M.R. (1996). Reactions of polynuclear aromatic hydrocarbons on soil. Environmental Science and Technology, **30**, 1145-1151.

KEDDY, C., GREENE, J.C. et BONNELL, M.A. (1994). A review of whole organism bioassays for assessing the quality of soil, freshwater sediment and freshwater in Canada, Environnement Canada, Scientific Series, n° 198.

KELSEY, J.W., KOTTLER, B.D. et ALEXANDER, M. (1997). Selective chemical extractants to predict bioavailability of soil-aged organic chemicals. Environmental Science and Technology, **31**, 214-217.

KILE, D.E., CHIOU, C.T., ZHOU, H., LI, H. et XU, O. (1995). Partition of nonpolar organic pollutants from water to soil and sediment organic matters. Environmental Science and Technology, **29**, 1401-1406.

KIMBLE, K.D. et CHIN, K. (1994). The sorption of polycyclic aromatic hydrocarbons by soils in low-methanol/water mixture. Journal of Contaminant Hydrology, **17**, 129-143.

KLASSEN, C.D. , M.O. AMDUR et Doull, J. (1986). Casarett and Doull's Toxicology Macmillan, NY, 974 p.

KOKTA, C. (1992). Measuring effects of chemicals in the laboratory: effect criteria and endpoints. Ecotoxicology of Earthworms, P.W. Greig -Smith, H. Becker, P.J. Edwards, P. Heimbach, Intercept Ltd, UK, 55-62.

KOWALSKA, M., HUYLGA, G. et COCKE, D.L. (1992). Interactions of clay with organic pollutant. The Science of the Total Environment, **141**, 223-240.

LAFRANCE, P. et BANTON, O. (1996). Évaluation environnementale des pratiques culturales sur maïs pour la réduction des pertes d'herbicides, INRS-Eau, R-390.

LANDRUM, P.F. et ROBBINS, J.A. (1990). Bioavailability of sediment-associated contaminants to benthic invertebrates. Sediments: Chemistry and Toxicity of In-Place Pollutants, R. Baudo, J.P. Giesy et H. Muntau, Lewis, Ann Arbor, USA, 237-263.

LOEHR, R.C. et WEBSTER M.T. (1996). Behavior of fresh vs. aged chemicals in soil. Journal of Soil Contamination, **5**, 361-383.

LOFS-HOLMIN, A. (1980). Measuring growth of earthworms as a method of testing sublethal toxicity of pesticides. Swedish Journal of Agricultural Research, **10**, 25-33.

LUERS, F. et TEN HULSHER, T.E.M. (1996). Temperature effect on the partitioning of polycyclic aromatic hydrocarbons between natural organic carbon and water. Chemosphere, **23**, 643-657.

MA, W., ELDELMAN, T., VAN BEERSUM, I. et JANS, T. (1983). Uptake of cadmium, zinc, lead and copper by earthworms near a zinc-smelting complex: Influence of soil pH and organic matter. Bulletin of Environmental Contamination Toxicology, **30**, 424-427.

MA, W., IMMERZEL, J. et BODT, J. (1995). Earthworm and food interactions on bioaccumulation and disappearance in soil of polycyclic aromatic hydrocarbons: studies on phenanthrene and fluoranthene. Ecotoxicology and Environmental safety, **32**, 226-232.

MADER, B.T., UWE-GOSS, K. et EISENREICH, S.J. (1997). Sorption of nonionic, hydrophobic organic chemicals to mineral surfaces. Environmental Science and Technology, **31**

MAHALAKSHMI-KORDYBACH, V., RYAN, Y.J. ET PEACOCK, J.M. (1995). Boron Toxicity in barley (*Hordeum vulgare*) seedlings in relation to soil temperature. Plant and Soil, **177**, 151-156.

MALECKI, P.R., NEUHAUSER, E.F. et LOEHR, R.C., (1984). The effect of metals on the growth and reproduction of *Eisenia foetida*. Pedobiologia, **24**, 129-137.

MALISZEWSKA, B. (1993). The effect of temperature on the rate of disappearance of polycyclic aromatic hydrocarbons from soils. Environmental Pollution, **79**, 15-20.

MANILAL, V.B. et ALEXANDER, M. (1991). Factors affecting the microbial degradation of phenanthrene in soil. Applied Microbiology Technologies, **35**, 401-405.

MAYER, A.M. et POLJAKOFF-MAYBER, A. (1989). The Germination of Seeds Pergamon, Oxford, 270 p.

MCCARTY, L.S. et MACKAY, D. (1993). Enhancing ecotoxicological modeling and assessment. Environmental Science and Technology, **27**, 1719-1727.

MEANS, J.C., WOOD, S.G., HASSET, J.J. et BANWART, W.L. (1980). Sorption of polynuclear aromatic hydrocarbons by sediments and soil. Environmental Science and Technology, **16**, 93-98.

MENZIE, C.A., POTOCKI, B.B. et SANTODONATO, J. (1992). Exposure to carcinogenic PAHs in the environment. Environmental Science and Technology, **26**, 1278-1283.

MIDDLETON, A.C., NACKLES, D.V. et LINZ, D.G. (1991). The influence of soil composition on bioremediation of contaminated sites, *Remediation*, aut. 1991, 391-406.

MINISTÈRE DE L'ENVIRONNEMENT ET DE LA FAUNE DU QUÉBEC (MEF). (1998). Politique de protection des sols et des terrains contaminés-Nouvelle politique, Les Publications du Québec, 124 p.

MURPHY, E.M., ZACHARA, J.M., SMITH, S et PHILLIPS, J.L. (1992). The sorption of humic acids to mineral surfaces and their role in contaminant binding. The Science of the Total Environment, **117**, 413-423.

NADEAU, D. (1997). Biologiste, Centre Hospitalier de l'Université Laval, conversation personnelle.

NEUHAUSER, E.F., LOEHR, R.C., et MALECKI, P.R. (1984). Growth and reproduction of the earthworm *Eisenia foetida* after exposure to sublethal concentrations of metals. Pedobiologia, **27**, 89-97.

NEUHAUSER, E.F., LOEHR, R.C., MALECKI, M.R., MILLIGAN, D.L. et DURKIN, P.R. (1985). The toxicity of selected organic chemicals to the earthworm *Eisenia foetida*. Journal of Environmental Quality, **14**, 383-388.

OADES, J.M. (1989). An introduction to organic matter in mineral soils. Minerals in Soil Environments, J.B. Dixon, S.B. Weeds, Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin, 89-160.

OCDE. (1984). Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques #208. Plantes terrestres, essai de croissance.

OCDE. (1984). Guideline for testing of chemicals no.207. Earthworms, acute toxicity tests.

PARK, K.S., SIMS, R.C., DUPONT, R.R., DOUCETTE, W.J. et MATTHEW, J.E. (1989). Fate of PAH compounds in two soil types: influence of volatilization, abiotic loss and biological activity.

PENNELL, K.D. et SURESH, P. (1992). Comment on "The surface area of organic matter". Environmental Science and Technology, **26**, 402-404.

PIEPEL, G.F. (1988). Programs for generating extreme vertices and centroids of linearly constrained experimental regions. Journal Quality of Technology, **20**, 125-139.

PIGNATELLO, J. J. et XING, B. (1996). Mechanisms of slow sorption of organic chemicals to natural particle. Environmental Science and Technology, **30**, 1-11.

PRESLEY, M.L., MCELROY, T.C. et DIEHL, W.J. (1996). Soil moisture and temperature interact to affect growth, survivorship, fecundity, and fitness in the earthworm *Eisenia foetida*. Comparative Biochemistry and Physiology, **114A**, 319-326.

RAMASWAMI, A. et LUTHY, R.G. (1997). Measuring and modeling physicochemical limitations to bioavailability and biodegradation. Manual of Environmental Microbiology, C.J. Hurst, ASM Press, Washington, 721-729.

REINECKE, A.J. (1992). A Review of Ecotoxicological Test Methods Using Earthworms. Ecotoxicology of Earthworms, H. B. P.W. Greig -Smith, P.J. Edwards, P. Heimbach, Intercept Ltd, UK, 7-19 .

RENOUX, A. (1995). Évaluation de bioprocédés d'assainissement en phase solide/liquide par l'utilisation de biotests écotoxicologiques, Thèse de doctorat, INRS-Eau, Canada.

ROBERT, M. et CHENU, C. (1992). Interactions between Soil Minerals and Microorganisms. Soil Biochemistry, G. Stotszky, J. Bollag, Marcel Dekker, NY, 307-404.

ROBERTS, B.L. et DOROUGH, H.W. (1984). Relative Toxicities of Chemicals to the Earthworm *Eisenia foetida*. Environmental Toxicology and Chemistry, **3**, 67-78.

ROBERTS, B.L. et DOROUGH, H.W. (1985). Hazards of chemicals to earthworms. Environmental Toxicology and Chemistry, **4**, 307-323.

ROBIDOUX, P. (1998). Écotoxicologue, Institut de Recherche en Biotechnologie

ROBINSON, K.G., FARMER, W.S. et NOVAK, J.T. (1990). Availability of sorbed toluene in soils for biodegradation by acclimated bacteria. Water Research, **24**, 345-350.

ROSSI, S.S. et NEFF, J.M. (1978). Toxicity of polynuclear aromatic hydrocarbons to the polychaete *Neanthes arenaceodentata*. Marine Pollution Bulletin, **9**, 220-223.

RUTHERFORD, D.W., CHIOU, C.T. et KILE, D.E. (1992). Influence of soil organic matter composition on the partition of organic compounds. Environmental Science and Technology, **26**, 336-340.

SANTINI, K. (1998). Évaluation du danger écotoxicologique associé à l'utilisation de *Phanerochaete Chrysosporium* pour la biorestauration d'un sol contaminé aux HAP. Mémoire de maîtrise, École Polytechnique de Montréal, Canada.

SAUCIER, J-Y. (1988). Les HAP: nouvelles vedettes dans le monde des contaminants, Milieu, **36**, 21-23.

SCHWARZENBACH, R.P., GSCHWEND, P.M. et IMBODEN, D.M. (1993). Environmental Organic Chemistry. John Wiley et Sons, NY, 681 p.

SCRIBNER, S.L., BENZING, T.R., SUN S. et BOYD, S. (1992). Organic chemicals in the environment: desorption and bioavailability of aged simazine residue in soil from a continuous corn field, Journal of Environmental Quality, **21**, 115-120.

SENESE, N. et CHEN, Y. (1989) Interactions of toxic organic chemicals with humic substances, Toxic Organic Chemicals in Porous Media, Ecological Studies, Z. Gerstl, Y.Chen, U. Mingelgrin, B. Yaron, NY, 343 p.

SHEPPARD, S.C. et EVENDEN, W.G. (1992). Optimized design for earthworm survival tests in soil. Bulletin of Environmental Contamination Toxicology, **49**, 648-655.

SHEPPARD, S.C., GAUDET, C., SHEPPARD, M.I., CURTON, P.M. et WONG, M.P. (1992). The development of assessment and remediation guidelines for contaminated soils, a review of the science. Canadian Journal of Soil Science, **72**, 359-394.

SMITH, B. (1991). An inter-and intra-agency survey of the use of plants for toxicity assessment. Plants for toxicity assessment, W. Gorsuch, W.R. Lower, W.Wang, M.A. Lewis, American Society for Testing and Materials, Philadelphie, 41-59.

SNEE, R. (1975). Experimental designs for quadratic models in constrained mixture spaces. Technometrics, **17**, 149-159.

SPOSITO, G. (1989). The Chemistry of Soils, Oxford University Press, NY, 277 p.

SPURGEON, D.J. et HOPKIN. (1996). Effects of variations in organic matter content and pH of soils on the availability and toxicity of zinc to the earthworm *Eisenia foetida*. Pedobiologia, 40, 80-96.

STATISTICA (1995). Industrial Statistics, Statsoft, US, vol. 4, p.4001-4463.

STENERSEN, J. (1992). Uptake and metabolism of xenobiotics by earthworms. Ecotoxicology of Earthworms, P.W. Greig-Smith, H. Becker, P.J. Edwards, P. Heimbach, Intercept Ltd, UK, 129-138.

STEVENSON, F.J. (1982). Organic matter reactions involving herbicides in soil, Journal of Environmental Quality, 1, 333-343.

STEVENSON, I.L. et SHNITZER, M. (1982). Transmission electron microscopy of extracted fulvic and humic acids. Soil Science, 133, 179-185.

TODD, D.K. (1980). Groundwater Hydrogeology, John Wiley et Sons, US, 535 p.

TRUHAUT, R. (1977). Ecotoxicology: objectives, principles and perspectives. Ecotoxicology and Environmental safety, 1, 151-173.

VAN GESTEL, C.A.M., MA, W. et SMITH, C. E. (1991a). Development of a QSARs in terrestrial ecotoxicology: earthworm toxicity and soil sorption of chlorophenols, chlorobenzenes and dichloroaniline. The Science of the Total Environment, 109, 589-604.

VAN GESTEL, C.A.M., MA, W., et SMITH. C.E. (1991b). Influence of cadmium, copper, and pentachlorophenol on growth and sexual development of *Eisenia andrei*. The Science of the Total Environment, 109/110, 585-597.

VAN GESTEL, C.A.M. (1992). The Influence of Soil Characteristics on the Toxicity of Chemicals for Earthworms: A Review. Ecotoxicology of Earthworms, P.W. Greig-Smith, H. Becker, P.J. Edwards, P. Heimbach, Intercept Ltd, UK, 44-54.

VAN GESTEL, C.A.M., DIRVEN-VAN BREEMAN, E.M., BAERSELMAN, R., EMANS, H.J.B., JANSSEN, J.A.M., et POSTUMA, R. (1992b). Comparison of sublethal and lethal criteria for nine different chemicals in standardized toxicity tests using the earthworm *Eisenia andrei*. Ecotoxicology and Environmental Safety, 23, 206-210.

VAN STRAALLEN, N.M. (1996). Ecotoxicology. Toxicology: Principles and Applications, D. V. Raymond, Mannfred et Hallinger, Boca Raton, FL, 284 p.

WANG, W. (1985). The use of plant seeds in toxicity tests of phenolic compounds, Environmental Internatational, 11, 49-55.

WANG, W. (1991). Litterature review on higher plants for toxicity testing. Water, Air, and Soil Pollution, 59, 381-400.

WHITE, C., KELSEY, J.W., HATZINGER, P.B. et ALEXANDER, M. (1997). Factors affecting sequestration and bioavailability of phenanthrene in soils. Environmental Toxicology and Chemistry, 16, 2040-2045.

WILDI, E., NAGEL, R. et STEINBERG, C.W.E. (1994). Effects of pH on the bioconcentration of pyrene in the larval midge, *Chironomus riparius*. Water Research, 28, 2553-2559.

WILSON, S.C. et JONES, K.C. (1993). Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs): A review. Environmental Pollution, 81, 229-249.

WINEGARDNER. (1996). An introduction to soils for environmental professionals, Boca Raton, Lewis, 270 p.

WONG, M.H. et BRADSHAW, A.D (1982). A comparaisn of the toxicity of heavy metals, using root elongation of rye grass, *Lolium perenne*. New Phitologist, 91, 255-261.

## ***ANNEXE A***

### ***Protocoles de caractérisation des sols***



### **A1. Granulométrie**

Les analyses granulométriques ont été effectuées dans les laboratoires de génie minéral de l'École Polytechnique de Montréal, selon les méthodes D421, D422, D1140, D2217 et E11 de l'*American Society for Testing and Materials (ASTM)*.

### **A2. pH**

Selon la méthode ASTM 4972-95A, dix grammes de chaque type de sol et 10 ml d'eau osmosée étaient mis dans un tube à centrifuger (2088, *Falcon*) de 50 ml et mélangés au vortex pendant une minute. Les sols étaient ensuite entreposés pendant 18 heures pour permettre l'atteinte de l'équilibre chimique et la décantation de l'argile en suspension. Les pH étaient mesurés dans le surnageant à l'aide d'un pH mètre (modèle 25, *Accumet*).

### **A3. Teneur en eau**

La connaissance de la teneur en eau des sols permet d'ajuster la quantité d'eau requise pour la réalisation des tests de toxicité. Cette teneur a été évaluée selon la méthode d'Environnement Canada (1979). Une dizaine de grammes de sol étaient mis dans une cupule préalablement pesée. Le poids humide de l'échantillon était mesuré avec une balance analytique ( $\pm 0,0001$  g). La cupule était ensuite mise au four à 105°C pendant 24 heures et le poids sec mesuré ( $\pm 0,0001$  g). Le contenu en eau était calculé à l'aide de l'équation suivante:

$$\text{contenu en eau (\%)} = \frac{\text{Poids du sol humide} - \text{poids du sol sec}}{\text{Poids du sol humide}} * 100$$

#### **A4. Capacité de rétention**

Quatre essais de capacité de rétention ont été effectués sur l'ensemble des types de sol selon la méthode d'Environnement Canada (1979). Un papier filtre (Whatmann GC #4) était placé sur un entonnoir conique supporté par un erlenmeyer. Après avoir mouillé le filtre par de l'eau osmosée, 10 g du sol à tester étaient mis dans le papier filtre. L'échantillon était hydraté en s'assurant qu'il était complètement imbibé. L'entonnoir était ensuite recouvert d'un papier adhésif pour prévenir l'évaporation de l'eau et une période minimum de 12 heures était allouée pour permettre à l'eau de s'écouler par gravité. Le sol humide était pesé ( $\pm 0,0001$  g) dans des cupules préalablement pesées ( $\pm 0,0001$  g), puis séché pendant au moins 24 heures à 105°C. Pour les deux premiers essais de capacité de rétention, les sols ont ensuite été pesés et la capacité de rétention calculée. Les résultats de ces essais ont été utilisés pour la réalisation de plusieurs essais de toxicité. Pour les troisième et quatrième essais, dont les résultats sont présentés au tableau 3.4, les sols secs étaient pulvérisés après la première pesée à l'aide d'une spatule, puis chauffés à 105°C pour une autre période supérieure à 24 heures. Le poids final était ensuite mesuré et la capacité de rétention calculée par l'équation ci-dessus:

$$\text{Capacité de rétention(\%)} = \frac{\text{poids humide} - \text{poids sec}}{\text{poids sec}} * 100$$

Les résultats de ces 4 essais sont présentés à l'annexe F.

### **A.5 Porosité et surface spécifique**

La réalisation des essais de porosité et de surface spécifique nécessite l'utilisation de sols secs. Les échantillons soumis à ces essais ont donc été chauffés à 105°C pendant environ 15 minutes. Pour les analyses de surfaces spécifiques, entre 1 et 2,5 g de sol ont été analysés pour chaque type de sol. Les surfaces spécifiques ont été mesurées à l'aide d'un seul mélange azote:hélium (30:70) (single point surface area measurement). Les quantités de sol testées étaient d'environ 0,7 g pour les analyses de porosimétrie et la pression exercée sur l'échantillon pour y faire pénétrer le mercure allait de 0 à 207 MPA.

## ***ANNEXE B***

### ***Contenu en métaux des composants purs***

**Tableau B1: Balayage des métaux dans le sol LG2**

	<b>Limite de détection (mg/kg de sol sec)</b>	<b>Analyse (mg/kg de sol sec)</b>	<b>Critère A (MEF,1998) (mg/kg de sol sec)</b>
Aluminium	10	3300	-
Argent	10	<10	2
Arsenic	0,5	<0,5	6
Baryum	10	26	200
Béryllium	2	<2	-
Bore	2	<2	-
Cadmium	1	<1	1,5
Calcium	20	3700	-
Chrome	5	19	85
Cobalt	5	<5	15
Cuivre	2	8	40
Étain	5	<5	5
Fer	10	12 000	-
Magnésium	20	2200	-
Manganèse	10	73	770
Mercure	0,02	<0,02	0,2
Molybdène	5	<5	2
Nickel	2	4	50
Phosphore	20	670	-
Plomb	10	<10	50
Potassium	100	740	-
Sélénium	0,5	<0,5	1
Sodium	50	280	-
Vanadium	10	20	-
Zinc	5	11	110

**Tableau B2: Balayage des métaux dans la matière organique**

	<b>Limite de détection (mg/kg de sol sec)</b>	<b>Analyse (mg/kg de sol sec)</b>	<b>Critère A (MEF,1998) (mg/kg de sol sec)</b>
Aluminium	10	2400	-
Argent	10	<10	2
Arsenic	0,5	4,6	6
Baryum	10	26	200
Béryllium	2	<2	-
Bore	2	2	-
Cadmium	1	<1	1,5
Calcium	20	48 000	-
Chrome	5	<5	85
Cobalt	5	<5	15
Cuivre	2	6	40
Étain	5	<5	5
Fer	10	10 000	-
Magnésium	20	2100	-
Manganèse	10	14	770
Mercure	0,02	0,07	0,2
Molybdène	5	<5	2
Nickel	2	5	50
Phosphore	20	620	-
Plomb	10	<10	50
Potassium	100	370	-
Sélénium	0,5	1,7	1
Sodium	50	200	-
Vanadium	10	<10	-
Zinc	5	7	110

***ANNEXE C***  
***Préparation des sols***

Cette annexe présente les quantités de chaque composant à mettre pour composer 1 kg de chaque type de sol. Ces quantités sont calculées à l'aide de la composition finale des sols et celle de chacun des composants à ajouter, présentées dans les tableaux C1 et C2.

**Tableau C1: Composition des 9 types de sol**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
limon (%)	25,0	25,0	25,0	25,0	25,0	25,0	25,0	25,0	25,0
sable (%)	65,0	67,3	69,5	52,5	54,8	57,0	40,0	42,5	44,5
argile (%)	5,0	5,0	5,0	17,5	17,5	17,5	30,0	30,0	30,0
matière organique (%)	5,0	2,75	0,5	5,0	2,75	0,5	5,0	2,75	0,5

**Tableau C2: Composition des composants**

	Sol LG2	Sable	Argile	Matière organique
Limon (%)	35			
Sable (%)	58	100		
Argile (%)	7		100	
Matière organique(%)	0			100

Par exemple, le calcul pour la préparation de 1 kg de sol 5 se fait de la façon suivante:

Quantités voulues:

limon:  $25 \% \cdot 1000 \text{ g} = 250,0 \text{ g}$

sable:  $54,8 \% \cdot 1000 \text{ g} = 548,0 \text{ g}$

argile:  $17,5 \% \cdot 1000 \text{ g} = 175,0 \text{ g}$

matière organique:  $2,75 \% \cdot 1000 \text{ g} = 27,5 \text{ g}$

- La quantité de sol LG2 à mettre dans chaque type de sol est calculée de façon à obtenir 250,0 g de silt. Comme le sol LG2 contient 35 % de silt, chaque sol doit contenir 714,3 g de sol LG2 ( $250 \text{ g} / 35\%$ ).
- Pour obtenir 548,0 g de sable il faut tenir compte de la quantité de sol déjà dans le sol LG2, soit 414,3 g ( $714,3 \text{ g} \cdot 58 \%$ ). Il faut donc ajouter 133,7 g de sable au sol LG2.



- Pour obtenir 175,0 g d'argile, il faut tenir compte de la quantité d'argile déjà dans le sol LG2, soit 50 g ( $714,3 \text{ g} \times 7 \%$ ). Il faut donc ajouter 125 g de sable au sol LG2.
- Pour 27,5 g de matière organique, il faut ajouter 27,5 g de matière organique car le sol LG2 n'en contient pas.

Ces calculs sont répétés pour les autres types de sol. Les résultats sont présentés ci-dessous.

**Tableau C3: Quantités de sol à mettre pour obtenir 1 kg des 9 types de sol**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Sol LG2 (g)	714,3	714,3	714,3	714,3	714,3	714,3	714,3	714,3	714,3
argile (g)	-	-	-	125,0	125,0	125,0	250,0	250,0	250,0
sable (g)	235,7	258,2	280,7	110,7	133,2	155,7	-14,3	8,2	30,7
m. organique (g)	50,0	27,5	5,0	50,0	27,5	5,0	50,0	27,5	5,0

Les essais sur la teneur en eau des composés purs a montré que la matière organique et l'argile contiennent respectivement 5 et 1 % d'eau. Les quantités à mélanger pour la préparation des sols ont donc été réajustées en fonction de ces résultats (voir tableau D4).

**Tableau C4: Quantités de sol à mettre pour obtenir 1 kg des 9 types de sol en tenant compte de l'humidité des composants**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Sol LG2 (g)	714,3	714,3	714,3	714,3	714,3	714,3	714,3	714,3	714,3
argile(g)	-	-	-	126,3	126,3	126,3	252,5	252,5	252,5
sable (g)	235,7	258,2	280,7	110,7	133,2	155,7	-14,3	8,2	30,7
m. organique(g)	52,6	28,9	5,3	52,6	28,9	5,3	52,6	28,9	5,3

## ***ANNEXE D***

### ***Protocole du test de germination et croissance du cresson *Lepidium sativum****

### **Germination et croissance du cresson *Lepidium sativum***

Le protocole utilisé est basé sur la méthode ISO 11269-2 et mesure la germination et la croissance du cresson *Lepidium sativum* dans un test statique de 16 jours. Les tests ont été réalisés par le laboratoire ECO. Chaque échantillon à tester était constitué de 520 g de sol sec répartis en 4 réplicats de 130 g dont le contenu en eau a été ajusté à 55 % de la capacité de rétention avec de l'eau osmosée. Pour effectuer l'essai, dix graines de cresson ont été déposées dans chaque réplicat expérimental. Tous les échantillons de sol ont été placés à l'obscurité pour un délai de 2 jours dans une chambre thermostatée ( $24 \pm 2^\circ\text{C}$ ). Les graines ont ensuite été soumises à une photopériode (7000 lux) journalière de 16 h.

Après un délai de 4 jours, les graines de cresson ont été dénombrées visuellement et les pourcentages de germination calculés par rapport au sol témoin. Après une exposition totale de 16 jours, la croissance a été évaluée en dénombrant les graines de cresson développées et en mesurant la biomasse de la plante poussée (poids sec) par rapport au sol témoin. Le témoin standard (50% de silice 40 mesh, 25 % de silice 24 mesh, 20 % de kaolinite et 5 % de tourbe) a été utilisé comme contrôle de qualité, tandis que le chlorure de mercure a été utilisé comme toxique de référence. Les résultats sont rapportés de la même façon que dans le cas du test de l'orge présenté à la section 3.1.5.2.

## ***ANNEXE E***

### ***Contamination des sols et tests de toxicité***

Cette annexe présente les protocoles de l'ensemble des essais de toxicité effectués dans le cadre du projet, à l'exception de ceux visant à déterminer l'influence de la matrice de sol sur les organismes des tests de toxicité (section 3.1.5). Ces protocoles constituent des résumés des protocoles expérimentaux élaborés dans du projet. Une version détaillée est disponible à la Chaire de bioassainissement des sites contaminés. Toutes les concentrations sont exprimées sur une base de sol sec.

**PE 5B: orge *H. vulgare***

**Contaminant** : Pyrène

**Objectif** : Déterminer la  $CI_{50}$  de la germination et de la croissance de l'orge dans le sol 5.

**Nombre de réplicats** : 3 pétris/concentration

**Concentration de la solution mère** : Six solutions mère différentes ont été composées.

**Concentrations** : La littérature ne rapporte aucune donnée sur la toxicité du pyrène pour l'orge. L'intervalle étudié est donc important.

**Tableau E1: Concentrations pour déterminer la  $CI_{50}$  du pyrène**

No de la concentration	Quantité de sol (g)	Concentration finale (mg/kg)	Quantité de pyrène (g)	Quantité d'acétone (ml)
1	330	30 000	9,900	190
2	330	10 000	3,300	190
3	330	3000	0,990	190
4	330	1000	0,330	190
5	330	300	0,0990	190
6	330	100	0,0330	190
7	330	0	0	190
8	330	0	0	0

**Volatilisation** : 18 heures

**Hydratation** : 23,3 ml/100 g de sol sec (voir annexe F).

**Vieillessement** : 8 jours

**PE 5C: orge *H.vulgare***

- Contaminants** : Fluorène (F), acénaphthène(A)
- Objectif** : Évaluer grossièrement la toxicité de quelques contaminants pour la germination et la croissance de l'orge dans le sol 5.
- Nombre de réplicats** : 1 pétri/concentration/contaminant
- Concentration de la solution mère** : 0,07 g/ml
- Concentrations** : La littérature ne rapporte aucune donnée sur la toxicité de l'acénaphthène et du fluorène pour l'orge. L'intervalle étudié est donc important.

**Tableau E2 Concentrations pour déterminer la  $CI_{50}$  de 2 HAP**

Nom du sol	Quantité de sol (g)	Concentration finale (mg/kg)	Quantité de solution mère (ml)	Quantité d'acétone (ml)
F1	105	1000	1,43	8,57
F2	105	5000	7,14	2,86
F3	105	20 000	28,6	0
A1	105	1000	1,43	8,57
A2	105	5000	7,14	2,86
A3	105	20 000	28,6	0

- Volatilisation** : une heure, en raison du nombre de sol à contaminer. En effet, ce protocole a été réalisé simultanément avec celui décrit au PE 6B.
- Hydratation** : 23,3 ml/100 g de sol sec (annexe F)
- Vieillessement** : 18 heures
- Réalisation du test** : Le test n'a duré que 12 jours au lieu de 14 et les pousses n'ont pas été séchées.

**PE 5D1: orge *H.vulgare*****Contaminant** : Acénaphthène**Objectif** : Vérifier la possibilité de développer un test de toxicité basé sur la mesure de la croissance racinaire de l'orge.**Nombre de réplicats** : 3 pétris/concentration**Concentration de la solution mère** : 0,063 g/ml**Concentrations** : Selon les résultats du test préliminaire, il n'y a pas de croissance des racines à 1000 mg/kg. Les concentrations testées étaient donc inférieures à 800 mg/kg.**Tableau E3: Concentrations pour explorer l'effet de l'acénaphthène sur les racines de l'orge**

Quantité de sol (g)	Concentration finale (mg/kg)	Quantité de solution mère (ml)	Quantité d'acétone (ml)
315	800	4,03	4,0
315	400	2,01	6,0
315	100	1,00	7,0
315	50	0,50	7,5
315	Témoin	0	0

**Volatilisation** : 18 heures**Hydratation** : 23,3 ml/100 g de sol sec (annexe F)**Vieillissement** : 8 jours

**PE 5D2: orge *H.vulgare*****Contaminant** : Acénaphthène

**Objectifs** : Évaluer avec précision la concentration où il y a 50 % d'inhibition de la croissance des racines et développer une méthode efficace de lavage.  
Vérifier si l'hydratation peut affecter la germination dans le sol 5 non contaminé.

**Nombre de réplicats** : 3 pétris/concentration

**Concentration de la solution mère** : 0,05 g/ml

**Concentrations** : Les résultats de la réalisation du protocole 5D1 ont montré que le gradient de croissance se situe entre 100 et 200 mg/kg.

**Tableau E4: Concentrations pour déterminer la  $CI_{50}$  de l'acénaphthène sur les racines de l'orge**

No de la concentration	Quantité de sol (g)	Concentration finale (mg/kg)	Quantité de solution mère (ml)	Quantité d'acétone (ml)
1	350	200	1,4	7,6
2	350	175	1,225	7,8
3	350	150	1,95	7,0
4	350	125	0,875	7,0
5	350	100	0,7	7,0
6	350	0	19 ml d'eau/pétri	0
7	350	0	25 ml d'eau/pétri	0

**Volatilisation** : 18 heures**Hydratation** : 23,3 ml/100 g de sol sec (annexe F)**Vieillessement** : 8 jours



**PE 5E: orge *H.vulgare*****Contaminant** : Phénanthrène**Objectifs** : Déterminer la  $CI_{50}$  pour la germination et la croissance de l'orge dans le sol 5.**Nombre de réplicats** : 3 pétris/concentration**Concentration de la solution mère** : 0,020 g/ml**Concentrations** : La littérature ne rapporte aucune donnée sur la toxicité du phénanthrène pour l'orge. L'intervalle étudié est donc important.**Tableau E5: Concentrations pour déterminer la  $CI_{50}$  du phénanthrène**

No de concentration	Quantité de sol (g)	Concentration finale (mg/kg)	Quantité de solution mère (ml)	Quantité d'acétone (ml)
1	330	0	0	10,0
2	330	156	0,26	10,0
3	330	312	0,52	10,0
4	330	625	1,03	9,0
5	330	1250	2,06	8,0
6	330	2500	4,12	6,0
7	330	5000	8,25	2,0
8	330	10 000	16,50	0
9	330	20 000	32,00	0

**Volatilisation** : 18 heures**Hydratation** : 23,3 ml/100 g de sol sec (annexe F)**Vieillessement** : 8 jours

**PE 6B: ver *E.foetida***

**Contaminants** : Fluorène (F), acénaphthène(A), pyrène (P)

**Objectif** : Évaluer la toxicité de quelques contaminants pour choisir le contaminant utilisé dans le cadre du projet.

**Nombre de réplicats** : 4 (8 vers)/ concentration/contaminant

**Concentration de la solution mère** : 0,040 g/ml

**Concentrations** : La littérature rapporte une  $CL_{50}$  de 173 mg/kg pour le fluorène dans les sols et l'acénaphthène est réputé plus toxique (Neuhauser *et al.*, 1985). Aucune donnée n'est disponible pour le pyrène.

**Tableau E6: Concentrations pour déterminer la  $CL_{50}$  de 3 HAP**

Nom du sol	Quantité de sol (g)	Concentration finale (mg/kg)	Quantité de solution mère (ml)	Quantité d'acétone (ml)
P1	165	300	1,2	8,8
P2	165	1000	4,1	5,9
P3	165	3000	12,4	0
F1	165	300	1,2	8,8
F2	165	1000	4,1	5,9
F3	165	3000	12,4	0
A1	165	300	1,2	8,8
A2	165	1000	4,1	5,9
A3	165	3000	12,4	0

**Volatilisation** : une heure, à cause du nombre de sols à contaminer. En effet, ce test a été réalisé simultanément avec le protocole 5C.

**Hydratation** : 7 ml/100 g de sol sec (voir annexe F)

**Vieillessement** : 8 jours

**Réalisation du test** : Le test n'a duré que 12 jours au lieu de 14.

**PE 6C: ver *E. foetida*****Contaminant** : Acénaphthène**Objectif** : Déterminer la CL<sub>50</sub> dans le sol 5.**Nombre de réplicats** : 15 réplicats (30 vers) /concentration**Concentration de la solution mère** : 0,050 g/ml**Concentrations** : Les résultats du protocole 6B ont montré qu'il y a 100 % de mortalité en 7 jours à une concentration de 300 mg/kg .**Tableau E7: Concentrations pour déterminer la CL<sub>50</sub> de l'acénaphthène**

No de concentration	Quantité de sol (g)	Concentration finale (mg/kg)	Quantité de solution mère (ml)	Quantité d'acétone (ml)
1	620	280	3,47	11,5
2	620	196	2,43	12,6
3	620	137	1,70	13,0
4	620	96	1,19	13,8
5	620	67	0,83	14,2
6	620	20	0,25	14,3
8	620	Témoin	-	-

**Volatilisation** : 18 heures**Hydratation** : 7 ml/40 g de sol sec (voir annexe F)**Vieillessement** : 8 jours

**PE 6D: ver *E.foetida*****Contaminant** : Fluorène**Objectif** : Déterminer la CL<sub>50</sub> dans le sol 5.**Nombre de réplicats** : 15 réplicats (30 vers) /concentration**Concentration de la solution mère** : 0,050 g/ml**Concentrations** : Les résultats du protocole 6B ont montré qu'il y a 100 % de mortalité en 14 jours à une concentration de 300 mg/kg.**Tableau E8: Concentrations pour déterminer la CL<sub>50</sub> du fluorène**

No de la concentration	Quantité de sol (g)	Concentration finale (mg/kg)	Quantité de solution mère (ml)	Quantité d'acétone (ml)
1	620	250	3,09	5,0
2	620	200	2,47	5,5
3	620	175	2,16	6,0
5	620	150	1,85	6,0
6	620	130	1,61	6,5
8	620	0	-	10,0

**Volatilisation** : 18 heures**Hydratation** : 7 ml/40 g de sol sec (voir annexe F)**Vieillessement** : 8 jours

**PE 6E: ver *E. foetida*****Contaminant** : Pyrène**Objectif** : Déterminer la CL<sub>50</sub>.**Nombre de réplicats** : 10 réplicats (20 vers) /concentration**Concentration de la solution mère** : 0.050 g/ml**Concentrations** : Les résultats du protocole 6B ont montré qu'à 14 jours, il y avait 0% de mortalité à 1500 mg/kg et 50 % à 3000 mg/kg.**Tableau E9: Concentrations pour déterminer la CL<sub>50</sub> du pyrène**

No de la concentration	Quantité de sol (g)	Concentration finale (mg/kg)	Quantité de solution mère (ml)
1	420	1500	12,6
2	420	2000	16,8
3	420	2500	21,0
4	420	3000	39,0
5	420	3500	29,4
6	420	4000	33,6
7	420	4500	37,8
8	420	5000	42,0
9	420	5500	46,2
10	420	6000	50,4
11	420	6500	54,6
12	420	7000	58,8
13	420	8000	67,2
14	420	9000	75,6

**Volatilisation** : 1h30**Hydratation** : 7 ml/40 g de sol sec (voir annexe F)**Vieillissement** : 8 jours

**PE 6F1: ver *E.foetida*****Contaminant** : Phénanthrène**Objectif** : Déterminer la CL<sub>50</sub> dans le sol 5.**Nombre de réplicats** : 15 réplicats (20 vers) /concentration**Concentration de la solution mère** : 0,20 g/ml**Concentrations** : Aucune donnée n'est disponible dans la littérature. L'intervalle étudié est donc large.**Tableau E10: Concentrations pour déterminer la CL<sub>50</sub> du phénanthrène**

No de la concentration	Quantité de sol (g)	Concentration finale (mg/kg)	Quantité de solution mère (ml)	Quantité d'acétone (ml)
1	620	16	0,0484	10,0
2	620	31	0,097	10,0
3	620	63	0,194	10,0
4	620	125	0,3875	9,7
5	620	250	0,775	9,3
6	405	500	1,01	9,0
7	620	1000	3,1	7,0
8	620	2000	6,2	3,8
9	620	0	-	10,0

**Volatilisation** : 1h 30**Hydratation** : 7 ml/40 g de sol sec (voir annexe F)**Vieillessement** : 8 jours

**6F2: ver *E.foetida*****Contaminant** : Phénanthrène**Objectif** : Préciser la CL<sub>50</sub> obtenue par le PE 6F1.**Nombre de réplicats** : 10 réplicats (20 vers) /concentration**Concentration de la solution mère** : 0,10 g/ml**Concentrations** : Les résultats du protocole 6F1 laissent supposer que la CL<sub>50</sub> du phénanthrène se situe entre 250 et 500 mg/kg.**Tableau E11: Concentrations pour déterminer la CL<sub>50</sub> du phénanthrène**

No de la concentration	Quantité de sol (g)	Concentration finale (mg/kg)	Quantité de solution mère (ml)	Quantité d'acétone (ml)
1	630	0	0	10,0
2	630	250	1,58	8,5
3	630	300	1,89	8,1
4	630	340	2,14	8,0
5	630	380	2,39	7,6
6	630	420	2,65	7,5
7	630	460	2,90	7,1
8	630	500	3,15	6,9
9	630	760	4,73	5,3

**Volatilisation** : 1h 30**Hydratation** : 7 ml/40 g de sol sec (voir annexe F)**Vieillissement** : 8 jours

**PE 6G: ver *E.foetida*****Contaminant** : Fluorène**Objectifs** : Évaluer la  $CL_{50}$  avec de nouvelles conditions de préparation des sols et de réalisation du test de toxicité.**Nombre de réplicats** : 15 réplicats (30 vers) /concentration**Concentration de la solution mère** : 0,10 g/ml**Concentrations** : Les résultats du protocole 6D ont montré que la  $CL_{50}$  dans le sol 5 est de 135 mg/kg. Comme il est supposé qu'une importante partie du fluorène s'est volatilisée lors de cet essai, la  $CL_{50}$  est probablement plus faible.**Tableau E12: Concentrations pour déterminer la  $CL_{50}$  du fluorène**

No de la concentration	Quantité de sol (g)	Concentration finale (mg/kg)	Quantité de solution mère (ml)	Quantité d'acétone (ml)
1	630	0	0	10,0
2	630	80	1,01	9,0
3	630	110	1,39	8,6
4	630	130	1,64	8,4
5	630	150	1,89	8,1

Pour minimiser la volatilisation du fluorène, les sols ont été hydratés avant la contamination. Le poids du plat en pyrex a été mesuré immédiatement après l'hydratation et après la période de volatilisation du solvant d'une heure et le contenu en eau du sol réajusté selon la différence entre ces deux valeurs.

**Volatilisation** : 1h 30**Hydratation** : 7 ml/40 g de sol sec (voir annexe F)**Vieillessement** : 8 jours



**Réalisation des tests :**

La mise en contact des vers avec le sol a été réalisée sous la hotte plutôt que dans pour empêcher que le fluorène, légèrement volatil, ne contamine l'incubateur habituellement utilisé. Les 15 réplicats de chacun des types de sol ont également été mis dans un sac de plastique (Ziploc) entrouvert pour permettre la respiration des vers tout en limitant la volatilisation. La température a été mesurée par un thermomètre installé sous la hotte et a été de 22 °C tout au long de l'essai. La photopériode de 16 heures était assurée par une lampe munie d'un minuteur.

**PE 7: cresson (*L. sativum*)**

**Contaminant** : Phénanthrène

**Objectifs** : Évaluer la toxicité du phénanthrène pour le cresson

**Nombre de réplicats** : 4 réplicats (40 graines) /concentration

**Concentration de la solution mère** : 0,20 g/ml

**Concentrations** : Aucune donnée n'est disponible dans la littérature. L'intervalle est donc large.

**Tableau E13: Concentrations pour déterminer la  $CL_{50}$  du phénanthrène**

No de la concentration	Quantité de sol (g)	Concentration finale (mg/kg)	Quantité de solution mère (ml)	Quantité d'acétone (ml)
1	550	0	0	10,0
2	550	625	1,70	8,3
3	550	1250	3,45	6,5
4	550	2500	6,90	3,1
5	550	5000	13,80	0
6	550	10 000	27,60	0

**Volatilisation** : 1h 30

**Hydratation** : 18,9 ml/130 g de sol sec (voir annexe F)

**Vieillessement** : 8 jours

## ***ANNEXE F***

### ***Capacité de rétention et hydratation des sols***

## F1 Capacités de rétention

Quatre essais de capacité de rétention ont été effectués, à différents temps et sur différentes préparations de sol. Les résultats obtenus sont présentés dans les 4 tableaux ci-dessous.

**Tableau F1: Premier essai de capacité de rétention**

Sol	1	2	3	4	5	6	7	8	9
(%) capacité de rétention	21,1	18,1	16,4	24,4	23,6	18,8	31,2	30,3	27,3

**Tableau F2: Deuxième essai de capacité de rétention**

Sol	1	2	3	4	5	6	7	8	9
% capacité rétention	25,6	22,6	19,9	27,9	28,9	30	40,6	39,6	36,4

**Tableau F3: Troisième essai de capacité de rétention**

Sol	1	2	3	4	5	6	7	8	9
% capacité rétention	23,7	23,5	17,2	27,7	26,8	24,5	34,6	34,9	33,8

**Tableau F4: Quatrième essai de capacité de rétention**

Sol	1	2	3	4	5	6	7	8	9
% capacité rétention	25,0	22,8	18,2	27,2	26,7	23,6	35,7	32,6	33,1

Seuls les résultats des essais 3 et 4 seront utilisés pour la réalisation des essais visant à élaborer le modèle prédictif.

## **F2 Hydratation des sols pour les essais de toxicité**

Les quantités d'eau à ajouter pour la réalisation de chaque test de toxicité sont présentées ci-dessous. Elles correspondent à 85, 75 et 55 % de la capacité de rétention en eau des sols pour les tests utilisant respectivement l'orge, le ver et cresson.

### **Influence de la matrice de sol sur les organismes des tests de toxicité**

L'hydratation des 9 types de sol a été effectuée à partir des capacités de rétention du premier test (tableau F1).

**Tableau F5: Hydratation des 9 sols pour le test sur l'influence de la matrice**

<b>Sol</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>
Eau ver (ml)	6,1	5,3	4,9	7,1	6,9	5,6	8,9	8,8	8,1
Eau orge (ml)	17,5	15,1	13,8	20,1	19,7	15,8	25,5	25,2	22,9

### **Test sur la germination et la croissance de l'orge et de ses racines (5B, 5C, 5D1, 5D2)**

L'hydratation du sol 5 a été effectuée à partir de la capacité de rétention moyenne des 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> essais. Ceci correspond à 23,3 ml par 100 g de sol sec.

### **Test sur la germination et la croissance de l'orge pour le phénanthrène (5E)**

La quantité d'eau d'hydratation a été diminuée à 20,0 ml/100 g de sol sec car les résultats du protocole 5D2 ont montré que la croissance du témoin était favorisée lorsque le sol a une faible teneur en eau.

### **Test sur la germination et croissance du cresson pour le phénanthrène (7)**

La quantité d'eau ajoutée a été déterminée en fonction de la moyenne des 4 capacités de rétention obtenues pour le sol 5. Pour 130 g de sol sec, 18.9 ml d'eau ont été ajoutés.

### Test sur les vers: détermination de la $CL_{50}$ (6B, 6C, 6D, 6E, 6F1, 6F2, 6G)

En faisant la moyenne de l'ensemble des 3 premiers tests de capacités de rétention, la quantité d'eau ajoutée devrait être de 7,9 ml/g de sol sec. Cependant, les sols contaminés semblaient plus mouillés que les témoins dans le protocole 20-5B. Pour tenir compte de ce facteur, la quantité d'eau ajoutée à chacun des réplicats de 40 gr est donc réduite à 7,0 ml.

### Test sur les vers: validation de la méthodologie

Les quantités d'eau à ajouter, présentées au tableau F6 ont été déterminées selon les moyennes de capacité de rétention des 3<sup>ème</sup> et 4<sup>ème</sup> essais. Elles ont été diminuées de 10 % dans chacun des sols pour tenir compte de l'effet du contaminant sur l'adsorption de l'eau, comme dans le cas des autres tests réalisés sur le sol 5.

**Tableau F6: Hydratation pour le test de mortalité du ver *E. foetida***

Sol	1	3	5	7	9
Qté d'eau/40 g sec (ml)	6,3	4,7	7,0	9,0	8,8

### Test de volatilisation sur les sols 2, 5 et 8

Cette quantité a été déterminée selon les moyennes de capacité de rétention des 3<sup>ème</sup> et 4<sup>ème</sup> essais. La quantité d'eau ajoutée a été diminuée de 10 % dans chacun des sols pour tenir compte de l'effet du contaminant sur l'adsorption de l'eau, comme dans le cas des autres tests réalisés sur le sol 5.

**Tableau F7: Hydratation pour les tests de volatilisation du fluorène**

Sol	2	5	8
Qté d'eau/40 g sec (ml)	6,0	7,0	9,1

***ANNEXE G***  
***Analyses chimiques***

## **G1 Analyse des HAP**

Les analyses chimiques du contenu en HAP des sols ont été effectuées par un laboratoire externe (*Maxxam*). L'analyse des HAP est basée sur la méthode 8270 de l'EPA (1998) modifiée en mode SIM (Selective Ion Monitoring). L'échantillon de sol est homogénéisé puis séparé en deux fractions, la première servant à la détermination du contenu en eau et la seconde à la quantification massique des HAP. Cette dernière (2 g de sol) est asséchée à l'aide de sulfate de sodium pour fin d'analyse. Des standards de récupération (D10-anthracène, D10-pyrène, D12-benzo(a)pyrène) sont alors ajoutés au sol. L'extraction des HAP contenus dans le sol est réalisée à l'aide d'une solution acétone:dichlorométhane en utilisant une sonde à ultra-son selon la méthode 3550 de l'EPA (1998). La purification de l'échantillon est réalisée par chromatographie en perméation de gel selon la méthode 3640 (1998). L'analyse de l'extrait est ensuite effectuée par GC-MS en mode SIM.

## **G2 Analyse de plusieurs métaux (Ca, Mg, Na, K, Al, Ba, Be, Cd, Cr, Co, Cu, Fe, Pb, Mn, Mo, Ni, P, Ag, V, Zn, S)**

L'analyse est basée sur la méthode 3120b de l'ASTM (1995). L'échantillon est homogénéisé et environ 30 g de sol sont placés à l'étuve à 65 °C durant au moins 4 heures, ou jusqu'à ce que l'échantillon soit sec. L'échantillon est ensuite broyé à l'aide d'un mortier et d'un pilon afin de briser les agrégats et tamisé sur un tamis de nylon d'une ouverture de 2 mm.

De l'acide nitrique et chlorhydrique sont ensuite ajoutées à 0,5 g de l'échantillon, aux blancs, contrôles et solution-étalons, et la digestion est effectuée dans un bloc digesteur. Les digestats obtenus sont ensuite analysés à l'aide d'un spectrophotomètre d'émission à plasma d'argon ARL 3510 (type ICP). Lors de cette analyse, le digestat est entraîné dans le plasma d'argon par l'intermédiaire d'une pompe péristaltique et d'un nébuliseur. Les métaux sont atomisés dans le plasma et à cette haute température ( $\approx 10\,000^{\circ}\text{C}$ ), ils

émettent de l'énergie lumineuse à des longueurs d'onde qui leur sont spécifiques. La lumière émise est séparée à l'aide d'un réseau dispersif qui se positionne en fonction de chaque longueur d'onde et son intensité est mesurée à l'aide d'un détecteur photoélectrique.

Les concentrations des éléments dans l'échantillon sont déterminées par comparaison entre les intensités lumineuses respectives obtenues pour l'échantillon et les solutions-étalons (étalonnage direct).

### **G3 Analyse de l'arsenic et du sélénium**

L'analyse est basée sur la méthode 3114C et 3120B (ASTM, 1995). Elle repose sur la formation d'hydruure d'arsenic et de sélénium en faisant réagir l'échantillon avec du borohydruure de sodium ( $\text{NaBH}_4$ ) en milieu acide.

L'étape de préparation et de digestion du sol est identique à celle décrite à la section G2. Cependant, l'échantillon est ensuite dilué, additionné d'acide chlorhydrique et d'acide sulfurique, et chauffé au micro-ondes avant d'être analysé par le spectrophotomètre d'émission à plasma d'argon ARL 3510 (type ICP).

### **G4 Analyse du mercure**

L'analyse est basée sur la méthode 3112b de l'ASTM (1995). De l'acide chlorhydrique, nitrique et sulfurique sont ajoutées à 0,5 g de l'échantillon (homogénéisé et tamisé) à tester, des blancs, contrôles et solutions étalons. La digestion est effectuée dans un bain-marie pendant au moins 2 heures.

Le digestat est ensuite analysé dans un analyseur de mercure (*Pharmacia Fine Chemical*) avec une cellule de 30 cm. Les ions mercuriques, réduits en mercure élémentaire, sont amenés sous forme gazeuse dans une cellule. Le mercure contenu dans la cellule est dosé



par absorption atomique à l'aide d'un analyseur de mercure automatisé, par comparaison avec une deuxième cellule de référence contenant de l'air extra sec; la détection se fait à 254 nm.

La concentration de l'échantillon est déterminée par comparaison entre les absorbances respectives de l'échantillon et celles d'une gamme de solutions-étalons.

### **G5 Analyse de la quantité d'acétone résiduelle**

Les échantillons ont été préparés selon la méthode de standard de l'EPA 5030. Les sols n'ont pas été homogénéisés pour prévenir la volatilisation de l'acétone.

Des standards de récupération (D4-1,2-dichloroéthane, D8-toluène, 4 bromo-fluorobenzène) ont été ajoutés à la fraction de sol utilisée pour faire l'analyse (0.1g). La récupération de l'acétone a été réalisée par une méthode "purge and trap" et l'analyse de l'extrait a été effectuée selon la méthode de l'EPA 8260 (1998) par chromatographie capillaire en phase gazeuse.

## ***ANNEXE H***

### ***Résultats des essais préliminaires***

---

## H1 Germination et croissance de l'orge

Le tableau H1 présente les résultats sur la germination et la biomasse individuelle humide de l'orge pour le fluorène et l'acénaphthène. Tous les résultats sont exprimés sur une base de sol sec.

**Tableau H1: Tests préliminaires de germination et croissance de l'orge**

Conc. (mg/kg)	Fluorène		Acénaphthène	
	% de germination	biomasse totale humide (mg)	% de germination	biomasse totale humide (mg)
1000	2,5	-	90,0	86,0
5000	87,5	92,3	82,5	80,0
20 000	95,0	84,0	85,0	73,0

Dans le cas du fluorène, il n'y a eu aucune germination dans le sol contaminé par 1000 mg/kg. Ceci est difficilement explicable car le sol semblait pourtant bien humidifié et les graines ont poussé dans les deux autres sols ayant des concentration de fluorène plus élevées

## H2 Mortalité du ver *Eisenia foetida*

**Tableau H2: Test préliminaire de mortalité du ver *E. foetida***

Contaminant	Résultats
Acénaphthène	Tous les vers sont morts après 7 jours, dans les 3 concentrations.
Fluorène	À 7 jours, les vers des sols contenant 1000 et 3000 mg/kg étaient morts mais trois vers vivaient dans le sol contaminé par 300 mg/kg. Ces derniers étaient morts à 14 jours.
Pyrène	Aucune mortalité sur 7 jours. À 14 jours, 50 % des vers étaient morts dans le sol contaminé par 3000 mg/kg.